

09/673198
PCT/JP99/01987

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

14.04.99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1998年 4月14日

REC'D 14 JUN 1999

出願番号
Application Number:

平成10年特許願第103101号

WIPO PCT

出願人
Applicant(s):

協和醗酵工業株式会社

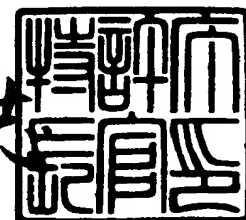
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 5月28日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山建志



出証番号 出証特平11-3033236

【書類名】 特許願

【整理番号】 H10-0201N2

【提出日】 平成10年 4月14日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明の名称】 微生物によるイソプレノイド化合物の製造方法

【請求項の数】 11

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市麻生区王禅寺 2 6 2 5

 【氏名】 三宅 浩一郎

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都町田市成瀬 2 丁目 1 2 - 1

 【氏名】 橋本 信一

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市市ヶ尾町 5 - 1 - 5

 【氏名】 本山 裕章

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都町田市中町 3 - 9 - 1 3

 【氏名】 尾崎 明夫

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都八王子市上野町 1 0 0 - 5

 【氏名】 瀬戸 治男

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都世田谷区代沢 2 - 1 1 - 5

 【氏名】 葛山 智久

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都文京区西片 1 - 9 - 5

 【氏名】 高橋 俊二

【特許出願人】

【識別番号】 000001029

【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

【代表者】 平田 正

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008187

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 微生物によるイソプレノイド化合物の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e) および (f) から選ばれる DNA を 1 つ以上含む DNA をベクターに組み込み、得られた組換え体 DNA を原核生物由来の宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培地に培養し、培養物中にイソプレノイド化合物を生成蓄積させ、該培養物からイソプレノイド化合物を採取することを特徴とする、イソプレノイド化合物の製造法。

(a) ピルビン酸とグリセルアルデヒド三リン酸から 1-デオキシキシルロース五リン酸を生成する反応を触媒する蛋白質をコードする DNA

(b) ファルネシルピロリン酸合成酵素をコードする DNA

(c) 配列番号 3 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする DNA、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつイソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質をコードする DNA

(d) 配列番号 4 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする DNA、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつイソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質をコードする DNA

(e) 配列番号 5 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする DNA、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ大腸菌のメチルエリスリトール要求性変異株を相補することのできる活性を有する蛋白質をコードする DNA

(f) (a)、(b)、(c)、(d) および (e) から選ばれる DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ選ばれた DNA にコードされた蛋白質が有する活性と実質的に同一の活性を有している蛋白質をコードする DNA

【請求項2】 ピルビン酸とグリセルアルデヒド三リン酸から 1-デオキシ

キシルロース五リン酸を生成する反応を触媒する蛋白質をコードするDNAが、配列番号1記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつピルビン酸とグリセルアルデヒド三リン酸から1-デオキシキシルロース五リン酸を生成する反応を触媒する活性を有する蛋白質をコードするDNAである、請求項1記載の製造法。

【請求項3】 DNAが、配列番号6記載の塩基配列を有するDNAである、請求項1または2記載の製造法。

【請求項4】 ファルネシルピロリン酸合成酵素をコードするDNAが、配列番号2記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつファルネシルピロリン酸合成酵素活性を有する蛋白質をコードするDNAである、請求項1記載の製造法。

【請求項5】 DNAが、配列番号7記載の塩基配列を有するDNAである、請求項1または4記載の製造法。

【請求項6】 DNAが、配列番号8、9および10記載の塩基配列から選ばれる塩基配列を有するDNAである、請求項1記載の製造法。

【請求項7】 形質転換体が、Escherichia属に属する微生物またはErwinia属に属する微生物である、請求項1記載の製造法。

【請求項8】 イソプレノイド化合物が、ユビキノン、ビタミンK2およびカロテノイドから選ばれるイソプレノイド化合物である、請求項1記載の製造方法。

【請求項9】 以下の(a)、(b)および(c)から選ばれるイソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質。

(a) 配列番号3記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質

(b) 配列番号4記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加さ

れたアミノ酸配列からなる蛋白質

(c) 配列番号5記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質

【請求項10】 請求項9記載の蛋白質をコードするDNAをベクターに組み込み、得られた組換え体DNAを宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培地に培養し、培養物中に該蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする、イソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質の製造法。

【請求項11】 形質転換体が、Escherichia属に属する微生物またはErwinia属に属する微生物である、請求項10記載の形質転換体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、原核生物由来の形質転換体を用いたイソプレノイド化合物の製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】

イソプレノイドとは、炭素数5のイソプレン単位を基本骨格に持つ化合物の総称で、イソペンテニルピロリン酸（IPP）の重合によって生合成される。自然界には多種多様なイソプレノイド化合物が存在しており、人類にとって有用なものも多い。

【0003】

例えば、ユビキノンは電子伝達系の必須成分として、生体内で重要な機能を果たしており、心疾患に効果のある医薬品として使用されているほか、欧米では健康食品としての需要が増大している。

ビタミンKは血液凝固系に関与する重要なビタミンであり、止血剤として利用されているほか、最近骨代謝への関与が示唆され、骨粗鬆症治療への応用が期待されており、フィロキノンとメナキロンは医薬品として許可されている。

【0004】

また、ユビキノンやビタミンK類には貝類の付着阻害作用があり、貝類付着防止塗料への応用が期待される。

さらに、カロテノイドと呼ばれる炭素数40のイソプレレン骨格を基本とする化合物は抗酸化作用があり、 β -カロチン、アスタキサンチン、クリプトキサンチンなど、がん予防や免疫賦活活性を有するものとして期待されているものもある。

【0005】

このように、イソプレノイド化合物には多くの有用物質が含まれており、これらの安価な製造法が確立されれば、社会的にも医学的にも多大な恩恵があると思われる。

発酵法によるイソプレノイド化合物の生産は以前から検討されており、培養条件の検討や変異処理による菌株育種、さらに遺伝子工学的手法による生産量の向上への試みもなされている。しかし、その効果は個々の化合物種に限定されており、イソプレノイド化合物全般に効果のある方法は知られていない。

【0006】

イソプレノイド化合物の基本骨格単位であるイソペンテニルピロリン酸 (IPP) は、動物や酵母などの真核生物ではアセチルCoAからメバロン酸を経由して生合成される (メバロン酸経路) ことが証明されている。

メバロン酸経路では3-ヒドロキシー-3-メチルグルタリルCoA (HMG-CoA) リダクターゼが律速と考えられており [Mol. Biol. Cell, 5, 655(1994)]、酵母において、HMG-CoAリダクターゼを高発現化させカロテノイドの生産性を上げる試みがなされている [三沢ら カロテノイド研究談話会講演要旨集(1997)]。

【0007】

原核生物ではメバロン酸経路の存在を証明した知見はなく、別の経路、即ち、ピルビン酸とグリセルアルデヒド三リン酸が縮合して生じる1-デオキシキシルロース五リン酸を経由してIPPが生合成されるという非メバロン酸経路が多く、原核生物において発見されている [Biochem. J., 295, 517 (1993)]。

大腸菌において、ピルビン酸とグリセルアルデヒド三リン酸を縮合させ1-デオキシキシルロース五リン酸を生合成させる酵素1-デオキシキシルロース五リン酸合成酵素(DXS)をコードする遺伝子が同定されている[Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 94, 12857 (1997)]。該遺伝子は、ファルネシルピロリン酸合成酵素をコードするispAを含む4つのORFからなるオペロンに含まれている。

【0008】

該オペロンに含まれるこれら遺伝子を操作して、イソプレノイド化合物の生産性を向上させることに関する記載も示唆も現時点ではない。

原核生物における非メバロン酸経路に関する知見は徐々に蓄積されつつあるが、関与する酵素やそれをコードする遺伝子の多くは未だ不明である。

光合成細菌において、コリスメートを4-ヒドロキシベンゾエートへ転換する酵素ubiCの遺伝子(ubiC遺伝子)およびp-ヒドロキシベンゾエートトランスフェラーゼの遺伝子(ubiA)を導入することにより、ユビキノーン-10を効率的に生産する方法が知られている(特開平8-107789)が、非メバロン酸経路の酵素遺伝子を操作することによってイソプレノイド化合物の生産性を向上させた例は皆無である。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、心疾患、骨粗鬆症、止血、がん予防、免疫賦活等を目的とした医薬品、健康食品および貝類付着防止塗料等に有用なイソプレノイド化合物の生合成に関与するDNAを1つ以上含むDNAをベクターに組み込み、得られた組換え体DNAを原核生物由来の宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培地に培養し、培養物中にイソプレノイド化合物を生成蓄積させ、該培養物からイソプレノイド化合物を採取することを特徴とする、イソプレノイド化合物の製造法、イソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質をコードするDNAを1つ以上含むDNAをベクターに組み込み、得られた組換え体DNAを宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培地に培養し、培養物中に該蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする、該蛋白質の製造法、および該蛋白質を提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、原核生物によるイソプレノイド生産性を向上させることのできるDNAを検索し、得られたDNAを原核生物に導入することにより、イソプレノイド生産性を向上させることのできることを見出し本発明を完成するに至った。

【0011】

即ち、本願の第1の発明は、以下の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)および(f)から選ばれるDNAを1つ以上含むDNAをベクターに組み込み、得られた組換え体DNAを原核生物由来の宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培地に培養し、培養物中にイソプレノイド化合物を生成蓄積させ、該培養物からイソプレノイド化合物を採取することを特徴とする、イソプレノイド化合物の製造法である。

【0012】

(a) はピルビン酸とグリセルアルデヒド三リン酸から1-デオキシキシルロース五リン酸を生成する反応を触媒する蛋白質をコードするDNA、

(b) はファルネシルピロリン酸合成酵素をコードするDNA、

(c) は配列番号3記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつイソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質をコードするDNA、

(d) は配列番号4記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつイソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質をコードするDNA、

(e) は配列番号5記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ大腸菌のメチルエリスリトール要求性変異株を相補することのできる活性を有する蛋白質をコードするD

NA、

(f) は (a)、(b)、(c)、(d) および (e) から選ばれるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ選ばれたDNAにコードされた蛋白質が有する活性と実質的に同一の活性を有している蛋白質をコードするDNAである。

【0013】

本明細書中の、アミノ酸の欠失、置換若しくは付加は、出願前周知技術である部位特異的変異誘発法により実施することができ、また、1若しくは数個のアミノ酸とは、部位特異的変異誘発法により欠失、置換若しくは付加できる程度の数のアミノ酸を意味する。

かかる1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質は、モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning, A laboratory manual)、第二版〔サンプブック(Sambrook)、フリッチ(Fritsch)、マニアチス(Maniatis)編集、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス (Cold Spring Harbor Laboratory Press)、1989年刊(以下、モレキュラー・クローニング 第二版と略す)〕、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci USA, 82, 488 (1985)等に記載の方法に準じて調製することができる。

【0014】

上記において、ピルビン酸とグリセルアルデヒド三リン酸から1-デオキシキシルロース五リン酸を生成する反応を触媒する蛋白質をコードするDNAとして、例えば、配列番号1記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつピルビン酸とグリセルアルデヒド三リン酸から1-デオキシキシルロース五リン酸を生成する反応を触媒する活性を有する蛋白質をコードするDNA等をあげることができる。

【0015】

具体的な例として、配列番号6記載の塩基配列を有するDNA等をあげることができる。

ファルネシルピロリン酸合成酵素をコードするDNAとして、例えば、配列番号2記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつファルネシルピロリン酸合成酵素活性を有する蛋白質をコードするDNAをあげることができる。具体的な例として、配列番号7記載の塩基配列を有するDNA等をあげることができる。

【0016】

配列番号3記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAの具体的な例として、配列番号8記載の塩基配列を有するDNA等をあげることができる。

配列番号4記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAの具体的な例として、配列番号9記載の塩基配列を有するDNA等をあげることができる。

配列番号5記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAの具体的な例として、配列番号10記載の塩基配列を有するDNA等をあげることができる。

【0017】

上記の「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA」とは、上記のDNAまたは該DNAの断片をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランクハイブリダイゼーション法、あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来のDNAまたは該DNAの断片を固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍程度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。

【0018】

ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング 第二版等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとして、具体的には配列番号1、2、3、4および5から選ばれる塩基配列と少なくとも70%以上の相同性を有するDNA、好ましくは90%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

【0019】

イソプレノイド化合物として、例えば、ユビキノン、ビタミンK₂、カロテノイド等をあげることができる。

本願の第2の発明は、以下の(a)、(b)および(c)から選ばれるイソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質：

(a) 配列番号3記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質、

(b) 配列番号4記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質、および

(c) 配列番号5記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質、

である。

【0020】

本願の第3の発明は、第2に記載の蛋白質をコードするDNAをベクターに組み込み、得られた組換え体DNAを宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培地に培養し、培養物中に該蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする、イソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質の製造法である。

【0021】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0022】

【発明の実施の形態】

I. イソプレノイド化合物の生合成に関与する蛋白質をコードするDNAの取得

(1) DXSをコードするDNA (DXS遺伝子) の塩基配列を利用した、イソプレノイド化合物の生合成に関与する蛋白質をコードするDNAの取得

既に決定されている、大腸菌の染色体およびDXS遺伝子の塩基配列情報 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 94, 12857 (1997)] を利用し、大腸菌よりDXS遺伝子を含む、あるいはDXS遺伝子近隣の遺伝子のDNA領域をPCR法 [Science, 230, 1350 (1985)] によりクローニングし、取得することができる。DXS遺伝子を含む塩基配列情報として、例えば、配列番号11に記載の塩基配列をあげることができる。

【0023】

DXS遺伝子を含むDNA領域の取得法としては、具体的には以下の方法をあげることができる。

大腸菌、例えばE. coli XL1-Blue株 (東洋紡より購入可能) を大腸菌に適した培地、例えばLB液体培地 [バクトトリプトン(ディフコ社製) 10g、酵母エキス(ディフコ社製) 5g、NaCl 5gを水1リットルに含みpH7.2に調整した培地] を用い常法に従って培養する。

【0024】

培養後、培養物より遠心分離により菌体を取得する。

取得した菌体より公知の方法 (例えば、モレキュラー・クローニング 第二版) に従い染色体DNAを単離する。

配列番号11に記載された塩基配列情報を利用し、DXS遺伝子を含む、あるいはDXS遺伝子近隣の遺伝子のDNA領域に対応する塩基配列を含有するセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーをDNA合成機を用いて合成する。

【0025】

PCR法により増幅後、該増幅DNA断片をプラスミドに導入可能なようにセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーの5'末端には適切制限酵素サイト、例えばBamHI、EcoRI等の制限酵素サイトを付加させることが好ま

しい。

該センスプライマー、アンチセンスプライマーの組合せとしては、例えば、配列番号12および13、配列番号14および15、配列番号12および16、配列番号17および18、配列番号19および13、配列番号22および23の組合せの塩基配列を有するDNA等をあげることができる。

【0026】

染色体DNAを鋳型として、これらプライマー、TaKaRa LA-PCRTM Kit Ver.2(宝酒造社製)またはExpandTM High-Fidelity PCR System(ベーリンガー・マンハイム社製)等を用い、DNA Thermal Cycler(パーキンエルマージャパン社製)でPCRを行う。

PCRの条件として、上記プライマーが2kb以下のDNA断片の場合には94℃で30秒間、55℃で30秒～1分間、72℃で2分間からなる反応工程を1サイクルとして、2kbを超えるDNA断片の場合には98℃で20秒間、68℃で3分間からなる反応工程を1サイクルとして、30サイクル行った後、72℃で7分間反応させる条件をあげることができる。

【0027】

該増幅されたDNA断片を、大腸菌で増幅可能な適切なベクターを上記プライマーで付与した制限酵素サイトと同じサイトで切断後、アガロース電気泳動、シユークロース密度勾配超遠心分離等の手法によりDNA断片を分画・回収する。

該回収DNA断片を用い、常法、例えば、モレキュラー・クローニング 第二版、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばSuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (ライフ・テクノロジーズ社製)やZAP-cDNA Synthesis Kit [ストラタジーン (Stratagene)社製]を用いクローニングベクターを作製し、作製した該クローニングベクターを用い、大腸菌、例えばE. coli DH5α株(東洋紡より購入可能)を形質転換する。

【0028】

該大腸菌を形質転換するためのクローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自律複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる、大腸菌の発現用ベクターをクローニングベクターとして用いてもよい。具体的には、ZAP Express [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、Lambda ZAP II (ストラタジーン社製)、 λ gt10、 λ gt11 [DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)]、 λ TriplEx (クローンテック社製)、 λ ExCell (ファルマシア社製)、pT7T318U (ファルマシア社製)、pcD2 [H.Okayama and P.Berg; Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)]、pMW218 (和光純薬社製)、pUC118 (宝酒造社製)、pEG400 [J. Bac., 172, 2392 (1990)]、pQE-30 (QIAGEN社製)等をあげることができる。

【0029】

得られた形質転換株より、目的とするDNAを含有したプラスミドを常法、例えば、モレキュラー・クローニング 第二版、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等に記載された方法により取得することができる。

【0030】

該方法により、ビルビン酸とグリセルアルデヒド三リン酸から1-デオキシキシルロース五リン酸を生成する反応を触媒する蛋白質をコードするDNA、ファルネシルピロリン酸合成酵素をコードするDNA、配列番号3記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、配列番号4記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA等を有するプラスミドおよびこれらDNAを1つ以上含むプラスミドを取得することができる。

【0031】

該プラスミドとして、例えば、上記DNAを全て含むプラスミドpADO-1、配列番号6記載の塩基配列を有するDNAを含むプラスミドpDXS-1あるいはpQEDXS-1、配列番号7記載の塩基配列を有するDNAを含むプラスミドpISP-1、配列番号8記載の塩基配列を有するDNAを含むプラスミド

p X S E-1、配列番号9記載の塩基配列を有するDNAを含むプラスミド p T F E-1等をあげることができる。

【0032】

これらプラスミドに挿入された大腸菌由来のDNA断片の塩基配列を利用し、他の原核生物、例えば、Rhodobacter属に属する微生物等より、該DNAのホモログを上記と同様の方法により取得することができる。

(2) 大腸菌のメチルエリスリトール要求性変異株を相補することのできる活性を有する蛋白質をコードするDNA (メチルエリスリトール要求性相補遺伝子)の取得

① 大腸菌メチルエリスリトール要求性変異株の取得

大腸菌、例えば E. coli W3110株 (ATCC14948) を、常法に従って培養する。

【0033】

培養後、得られた培養液より遠心分離により菌体を取得する。

該菌体を、適切な緩衝剤、例えば、0.05M トリス・マレイン酸緩衝液 (pH 6.0) 等で洗浄後、菌体濃度が $10^4 \sim 10^{10}$ 細胞/ml になるように同緩衝液に懸濁する。

該懸濁液を用いて常法により変異処理を行う。常法として、例えば、該懸濁液に NTG を終濃度が 600 mg/l になるように加え、室温で 20 分間保持して変異処理する方法をあげることができる。

【0034】

該変異処理懸濁液を最少寒天培地に 0.05~0.5% メチルエリスリトールを添加した培地で培養する。

最少寒天培地として、例えば、M9 培地 (モレキュラー・クローニング 第二版) に寒天を添加した培地等をあげることができる。

メチルエリスリトールは、Tetrahedron Letters, 38, 35, 6184 (1997) に記載の方法に準じて化学合成したものを用いることができる。

【0035】

培養後、生育し形成されたコロニーを、最少寒天培地とメチルエリスリトールを 0.05~0.5% 含む最少寒天培地にレプリカし、メチルエリスリトール要

求性を示すもの、すなわち、メチルエリスリトールを含む最少寒天培地では生育できるが、最少寒天培地では生育できない株を目的の変異株として選択する。

該操作により取得されたメチルエリスリトール要求性変異株としてME 7株をあげることができる。

【0036】

② メチルエリスリトール要求性相補遺伝子の取得

大腸菌、例えば、E. coli W3110株 (ATCC14948) を培養培地、例えば、LB液体培地に植菌し、常法に従って対数増殖期まで培養する。

培養後、得られた培養液を遠心分離して菌体を回収する。

得られた菌体より、常法（例えば、モレキュラー・クローニング 第二版に記載の方法）に従い染色体DNAを単離・精製する。上記（1）に記載の方法で取得される染色体DNAを単離・精製された染色体DNAとして用いることもできる。

【0037】

該染色体DNAの適当量を適切な制限酵素、例えば、Sau3A Iで部分消化し、得られた消化DNA断片を、常法、例えば、シュークロース密度勾配超遠心分離（26,000rpm、20℃、20hr）により、サイズ分画する。

該分画により取得される大きさが4～6kbのDNA断片を、適切な制限酵素で消化したベクター、例えば、pMW118（ニッポンジーン社製）にライゲーションすることにより染色体ゲノムライブラリーを作製する。

【0038】

作製した染色体ライブラリーを用い、上記①で分離されたメチルエリスリトール要求性変異株、例えば、ME 7株を常法（例えば、モレキュラー・クローニング 第二版に記載の方法）に従い形質転換する。

該形質転換体を、ベクターの有する薬剤耐性遺伝子に対応する薬剤を添加した最少寒天培地、例えば、アンピシリン100μg/1入れたM9寒天培地に塗布し、37℃で一晩培養する。

【0039】

該方法により、メチルエリスリトール要求性の回復された形質転換体を選択す

ることができる。

得られた該形質転換体より、常法によりプラスミドを抽出する。該メチルエリスリトール要求性を回復させることのできるプラスミドとして、例えばpMEW73をあげることができる。

【0040】

該プラスミド中に導入されたDNAの塩基配列を決定する。

該方法により決定された塩基配列として、配列番号10に示されるyaeM遺伝子の塩基配列を含む配列等をあげることができる。

II. イソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質の製造

上記のようにして得られたDNAを宿主細胞中で発現させるためには、まず、目的とする該DNA断片を、制限酵素類あるいはDNA分解酵素類で、該遺伝子を含む適当な長さのDNA断片とした後に、発現ベクター中プロモーターの下流に挿入し、次いで上記DNAを挿入した発現ベクターを、発現ベクターに適合した宿主細胞中に導入する。

【0041】

宿主細胞としては、目的とする遺伝子を発現できるものは全て用いることができる。例えば、エッシェリヒア属、セラチア属、コリネバクテリウム属、ブレヴィバクテリウム属、シュードモナス属、バチルス属、ミクロバクテリウム属等に属する細菌、クルイベロミセス属、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、トリコスポロン属、シワニオミセス属等に属する酵母や動物細胞、昆虫細胞等をあげることができる。

【0042】

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組込みが可能で、上記目的とするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

細菌等を宿主細胞として用いる場合は、上記DNAを発現させるための発現ベクターは該細菌中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、上記DNAおよび転写終結配列より構成された組換えベクターであるこ

とが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【0043】

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれもベーリンガーマンハイム社より市販）、pKK233-2（Pharmacia社製）、pSE280（Invitrogen社製）、pGEMEX-1（Promega社製）、pQE-8（QIAGEN社製）、pQE-30（QIAGEN社製）、pKYP10（特開昭58-110600）、pKYP200 [Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescriptII SK+、pBluescript II SK(-)（Stratagene社製）、pTrs30(FERM BP-5407)、pTrs32(FERM BP-5408)、pGEX（Pharmacia社製）、pET-3（Novagen社製）、pTerm2(US4686191、US4939094、US5160735)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pUC18 [gene, 33, 103 (1985)]、pUC19 [Gene, 33, 103 (1985)]、pSTV28(宝酒造社製)、pSTV29（宝酒造社製）、pUC118（宝酒造社製）、pPA1（特開昭63-233798）、pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392(1990)]等を例示することができる。

【0044】

プロモーターとしては、宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター（P trp）、lacプロモーター（P lac）、P_Lプロモーター、P_Rプロモーター、P_{SE}プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーター等をあげることができる。またP trpを2つ直列させたプロモーター（P trp x 2）、tacプロモーター、letIプロモーター、lacT7プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

【0045】

リボソーム結合配列としては、宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよいが、シャイン-ダルガノ（Shine-Dalgarno）配列と開始コドンとの間を適当な距離（例えば6～18塩基）に調節したプラスミッドを用いることが好ましい。

目的とするDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、好適には構造遺伝子直下に転写終結配列を配置することが望ましい。

【0046】

宿主細胞としては、Escherichia属、Corynebacterium属、Brevibacterium属、Bacillus属、Microbacterium属、Serratia属、Pseudomonas属、Agrobacterium属、Alicyclobacillus属、Anabaena属、Anacystis属、Arthrobacter属、Azobacter属、Chromatium属、Erwinia属、Methylobacterium属、Phormidium属、Rhodobacter属、Rhodopseudomonas属、Rhodospirillum属、Scenedesmun属、Streptomyces属、Synnecoccus属、Zymomonas属等に属する微生物をあげることができ、好ましくは、Escherichia属、Corynebacterium属、Brevibacterium属、Bacillus属、Pseudomonas属、Agrobacterium属、Alicyclobacillus属、Anabaena属、Anacystis属、Arthrobacter属、Azobacter属、Chromatium属、Erwinia属、Methylobacterium属、Phormidium属、Rhodobacter属、Rhodopseudomonas属、Rhodospirillum属、Scenedesmun属、Streptomyces属、Synnecoccus属、Zymomonas属に属する微生物等をあげることができる。

【0047】

該微生物の具体例として、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli DH5 α 、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Escherichia coli MP347、Escherichia coli NM522、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Brevibacterium flavum ATCC14067、Brevibacterium lactofermentum ATCC13869、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14297、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Pseudomonas s.p. D-0110、Agrobacterium radiobacter、Agrobacterium rhizogenes、Agrobacterium rubi、Anabaena cylindrica、Anabaena doliolum、Anabaena flos-aquae、Arthrobacter aurescens、Arthrobacter citreus、Arthrobacter globiformis

、Arthrobacter hydrocarboglutamicus、Arthrobacter mysorens、Arthrobacter nicotianae、Arthrobacter paraffineus、Arthrobacter protophormiae、Arthrobacter roseoparaffinus、Arthrobacter sulfureus、Arthrobacter ureafaciens、Chromatium buderii、Chromatium tepidum、Chromatium vinosum、Chromatium warmingii、Chromatium fluviatile、Erwinia uredovora、Erwinia carotovora、Erwinia ananas、Erwinia herbicola、Erwinia punctata、Erwinia terreus、Methylobacterium rhodesianum、Methylobacterium extorquens、Phormidium sp. ATCC29409、Rhodobacter capsulatus、Rhodobacter sphaeroides、Rhodopseudomonas blastica、Rhodopseudomonas marina、Rhodopseudomonas palustris、Rhodospirillum rubrum、Rhodospirillum salexigens、Rhodospirillum salinarum、Streptomyces ambofaciens、Streptomyces aureofaciens、Streptomyces aureus、Streptomyces fungicidicus、Streptomyces griseochromogenes、Streptomyces griseus、Streptomyces lividans、Streptomyces olivogriseus、Streptomyces rameus、Streptomyces tanashiensis、Streptomyces vinaceus、Zymomonas mobilis等をあげることができる。

【0048】

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭63-2483942)、またはGene, 17, 107 (1982)やMolecular & General Genetics, 168, 111 (1979)に記載の方法等をあげることができる。

【0049】

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEp 13 (ATCC37115)、YEp 24 (ATCC37051)、YCp 50 (ATCC37419)、pHS 19、pHS 15等を例示することができる。

プロモーターとしては、酵母中で発現できるものであればいかなるものでもよく、例えば、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF α 1プロモーター、CUP 1プロモーター

ター等のプロモーターをあげることができる。

【0050】

宿主細胞としては、サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、シゾサッカロミセス・ポンベ (Schizosaccharomyces pombe)、クリュイベロミセス・ラクチス (Kluyveromyces lactis)、トリコスポロン・プルランス (Trichosporon pullulans)、シュワニオミセス・アルピウス (Schwanniomyces alluvius)等をあげることができる。

【0051】

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163 (1983)]、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)記載の方法等をあげることができる。

【0052】

動物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、p cDNAI、p cDM8 (フナコシ社より市販)、p AGE107 [特開平3-22979; Cytotechnology, 3, 133, (1990)]、p AS3-3 (特開平2-227075)、p CDM8 [Nature, 329, 840, (1987)]、p cDNAI/Amp (Invitrogen社製)、p REP4 (Invitrogen社製)、p AGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、p AGE210等を例示することができる。

【0053】

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (ヒトCMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR α プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

【0054】

宿主細胞としては、ナマルバ細胞、HBT5637（特開昭63-299）、COS1細胞、COS7細胞、CHO細胞等をあげることができる。

動物細胞への組換えベクターの導入法としては、動物細胞にDNAを導入できるいかなる方法も用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133(1990)]、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法 [Proc.Natl.Acad.Sci.,USA, 84, 7413(1987)]、virology, 52, 456 (1973)に記載の方法等を用いることができる。形質転換体の取得および培養は、特開平2-227075号公報あるいは特開平2-257891号公報に記載されている方法に準じて行なうことができる。

【0055】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばバキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ・ア・ラボラトリー・マニュアル (Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サプリメント1-3 8 (1987-1997)、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。

【0056】

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII（ともにインビトロジェン社製）等をあげることができる。

【0057】

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラファ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞であるSf9、Sf21 [バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル、ダブリュー・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー (W. H. Fr

eeman and Company)、ニューヨーク (New York)、(1992)]、Trichoplusia ni の卵巣細胞である High 5 (インビトロジェン社製) 等を用いることができる。

【0058】

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等をあげることができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第二版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

【0059】

酵母、動物細胞または昆虫細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加された蛋白質を得ることができる。

上記DNAを組み込んだ組換え体DNAを保有する形質転換体を培地に培養し、培養物中にイソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質を生成蓄積させ、該培養物より該蛋白質を採取することにより、イソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質を製造することができる。

【0060】

本発明のイソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質製造用の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

本発明の形質転換体が大腸菌等の原核生物、酵母菌等の真核生物である場合、これら微生物を培養する培地は、該微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。

【0061】

炭素源としては、それぞれの微生物が資化し得るものであればよく、グルコー

ス、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類が用いられる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、等の各種無機酸や有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等が用いられる。

【0062】

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が用いられる。

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好気的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16時間～7日間である。培養中pHは、3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

【0063】

また培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸 (IAA) 等を培地に添加してもよい。

【0064】

動物細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI 1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122,

501 (1952))、DMEM培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。

【0065】

培養は、通常 pH 6~8、30~40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1~7日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地 [Pharmingen社製]、Sf-900 II SFM培地 (ギブコBRL社製)、ExCell 1400、ExCell 1405 [いずれもJRH Biosciences社製]、Grace's Insect Medium [Grace, T.C.C., Nature, 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。

【0066】

培養は、通常 pH 6~7、25~30℃等の条件下で、1~5日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

本発明の形質転換体の培養物から、本発明のイソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質を単離精製するには、通常の酵素の単離、精製法を用いればよい。

【0067】

例えば、本発明の蛋白質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) -セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化成社製) 等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (ファルマシア社製) 等のレジンを用いた陽イオン交換

クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを
用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニテ
ィークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電
気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができ
る。

【0068】

また、該蛋白質が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回
収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法によ
り該蛋白質を回収後、該蛋白質の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化
液を、蛋白質変性剤を含まないあるいは蛋白質変性剤の濃度が蛋白質が変性しな
い程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該蛋白質を正常な立体構造に構成
させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

【0069】

本発明の蛋白質あるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合に
は、培養上清に該蛋白質あるいはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することがで
きる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することによ
り可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いるこ
とにより、精製標品を得ることができる。

【0070】

このようにして取得される蛋白質として、例えば、配列番号1～5に示される
アミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を有する蛋白質をあげることができる。

また、上記方法により発現させた蛋白質を、Fmoc法(フルオレニルメチル
オキシカルボニル法)、tBoc法(t-ブチルオキシカルボニル法)等の化学合成
法によっても製造することができる。また、桑和貿易(米国Advanced chemTech社
製)、パーキンエルマージャパン(米国Perkin-Elmer社製)、ファルマシアバイオ
テク(スウェーデンPharmacia Biotech社製)、アロカ(米国Protein Technology I
nstrument社製)、クラボウ(米国Synthecell-Vega社製)、日本パーセプティブ・
リミテッド(米国PerSeptive社製)、島津製作所等のペプチド合成機を利用し合成
することもできる。

III. イソプレノイド化合物の製造

上記II. で取得された形質転換体を、上記II. の方法に準じて培養し、培養物中にイソプレノイド化合物を生成蓄積させ、該培養物からイソプレノイド化合物を採取することによりイソプレノイド化合物を製造することができる。

【0071】

該培養により、ユビキノン、ビタミンK₂、カロテノイド等のイソプレノイド化合物を製造することができる。具体的な例として、例えば、Escherichia属に属する微生物を形質転換体としたユビキノン-8やメナキノン-8の製造、Rhodobacter属に属する微生物を形質転換体としたユビキノン-10の製造、Arthrobacter属に属する微生物を形質転換体としたビタミンK₂の製造、Agrobacterium属に属する微生物を形質転換体としたアスタキサンチンの製造、Erwinia属に属する微生物を形質転換体としたリコペン、 β -カロテン、ゼアキサンチンの製造等をあげることができる。

【0072】

培養終了後、培養液に適当な溶媒を加えてイソプレノイド化合物を抽出し、遠心分離などで沈殿物を除去した後、各種クロマトグラフィーを行うことによりイソプレノイド化合物を単離・精製することができる。

以下に本発明の実施例を示すが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0073】

実施例で示した遺伝子組換え実験は、特に言及しない限りモレキュラー・クローニング 第二版に記載の方法（以下、常法と呼ぶ）を用いて行った。

【0074】

【実施例】

実施例1 イソプレノイド化合物の生合成に関与する蛋白質をコードするDNAの取得

(1) 大腸菌DXS遺伝子の塩基配列を利用した、イソプレノイド化合物の生合成に関与する蛋白質をコードするDNAの取得

E. coli XL1-Blue株（東洋紡より購入）を1白金耳、10mlのLB液体培地

に植菌し、37℃で一晩培養した。

【0075】

培養後、得られた培養液より遠心分離により菌体を取得した。

該菌体より、常法に従い染色体DNAを単離・精製した。

配列番号12および13、配列番号14および15、配列番号12および16、配列番号17および18、配列番号19および13の塩基配列の組合せを有する5'末端にB a mH IおよびE c oR I制限酵素切断部位をそれぞれ有するセンスプライマーおよびアンチセンスプライマー、配列番号22および23の塩基配列の組合せを有する5'末端にB a mH I制限酵素切断部位をそれぞれ有するセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーをDNA合成機を用いて合成した。

【0076】

染色体DNAを鋳型として、これらプライマーと、TaKaRa LA-PCRTM Kit Ver. 2(宝酒造社製)、ExpandTM High-Fidelity PCR System(ベーリンガー・マンハイム社製)またはTaq DNA polymerase (Boelinger社製)を用い、DNA Thermal Cycler(パーキンエルマージャパン社製)でPCRを行った。

PCRは、2kb以下のDNA断片は94℃で30秒間、55℃で30秒～1分間、72℃で2分間からなる反応工程を1サイクルとして、2kbを超えるDNA断片は98℃で20秒間、68℃で3分間からなる反応工程を1サイクルとして、30サイクル行った後、72℃で7分間反応させる条件で行った。

【0077】

PCRにより増幅されたDNA断片のうち、5'末端にB a mH IおよびE c oR I制限酵素切断部位をそれぞれ有するセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーを用いて増幅されたDNA断片は制限酵素B a mH IおよびE c oR Iで消化し、5'末端にB a mH I制限酵素切断部位をそれぞれ有するセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーを用いて増幅されたDNA断片は制限酵素B a mH Iで消化した。

【0078】

消化後、これら制限酵素処理DNA断片をアガロースゲル電気泳動し、B a m

H I - E c o R I 処理DNA断片およびB a m H I 処理DNA断片を取得した。

l a c プロモーターを有する広宿主域ベクター p E G 4 0 0 [J. Bac., 172, 2392 (1990)] を、制限酵素B a m H I およびE c o R I で消化後、アガロースゲル電気泳動を行い、B a m H I - E c o R I 処理 p E G 4 0 0 断片を取得した。

【0079】

p U C 1 1 8 (宝酒造社製) を制限酵素B a m H I で消化後、アガロースゲル電気泳動を行いB a m H I 処理 p U C 1 1 8 断片を取得した。

上記で取得されたB a m H I - E c o R I 処理DNA断片各々についてB a m H I - E c o R I 処理 p E G 4 0 0 断片と混合した後、エタノール沈殿を行い、得られたDNA沈殿物を5 μ l の蒸留水に溶解し、ライゲーション反応を行うことにより組換え体DNAを各々取得した。

【0080】

該組換え体DNAを用い、E. coli (東洋紡より購入) DH5 α 株を常法に従って形質転換後、該形質転換体をスペクチノマイシン100 μ g / m l を含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩培養した。

生育してきたスペクチノマイシン耐性の形質転換体のコロニー数個について、スペクチノマイシン100 μ g / m l を含むLB液体培地10 m l で37℃16時間振盪培養した。

【0081】

得られた培養液を遠心分離することにより菌体を取得した。

該菌体より常法に従ってプラスミドを単離した。

該方法により単離したプラスミドを各種制限酵素で切断して構造を調べ、塩基配列を決定することにより、目的のDNA断片が挿入されているプラスミドであることを確認した。

【0082】

配列番号6記載の塩基配列を有するDNA、配列番号7記載の塩基配列を有するDNA、配列番号8記載の塩基配列を有するDNAおよび配列番号9記載の塩基配列を有するDNAを含むプラスミドを p A D O - 1、配列番号6記載の塩基

配列を有するDNAを含むプラスミドをpDXS-1、配列番号7記載の塩基配列を有するDNAを含むプラスミドをpISP-1、配列番号8記載の塩基配列を有するDNAを含むプラスミドをpXSE-1、配列番号9記載の塩基配列を有するDNAを含むプラスミドをpTFE-1と命名した。

【0083】

また、上記で取得されたBamHI処理DNA断片およびBamHI処理pUC118断片を混合した後、エタノール沈殿を行い、得られたDNA沈殿物を5 μ lの蒸留水に溶解し、ライゲーション反応を行うことにより組換え体DNAを取得した。以後上記と同様の方法で、大腸菌を形質転換し、該大腸菌よりプラスミドを単離した。

【0084】

上記同様、該方法により単離したプラスミドを各種制限酵素で切断して構造を調べ、塩基配列を決定することにより、目的のDNA断片が挿入されているプラスミドであることを確認した。

該プラスミドをBamHI処理し、目的のDNA断片を上記と同様の方法で回収し、発現ベクターpQE30 (Qiagen社製)に常法によりサブクローニングした。

【0085】

該サブクローニングにより得られた、配列番号6記載の塩基配列を有するプラスミドをpQEDXS-1と命名した。

(2) メチルエリスリトール要求性相補遺伝子の取得

① 大腸菌メチルエリスリトール要求性変異株の取得

E. coli W3110株 (ATCC14948) を、LB液体培地に植菌し、対数増殖期まで培養した。

【0086】

培養後、得られた培養液より遠心分離により菌体を取得した。

該菌体を、0.05Mトリス-マレイン酸緩衝液 (pH6.0) で洗浄後、菌体濃度が10⁹細胞/mlになるように同緩衝液に懸濁した。

該懸濁液にNTGを終濃度が600mg/lになるように加え、室温で20分

間保持して変異処理を行った。

【0087】

得られた変異処理菌体をメチルエリスリトール0.1%を含むM9最少寒天培地〔モレキュラー・クローニング 第二版〕プレートに塗布し、培養した。メチルエリスリトールは、Tetrahedron Letters, 38, 35, 6184 (1997)に記載の方法に準じて化学合成した。

メチルエリスリトール0.1%を含むM9最少寒天培地上で生育してきたコロニーを、M9最少寒天培地とメチルエリスリトールを0.1%含むM9最少寒天培地にレプリカし、メチルエリスリトール要求性を示すもの、すなわち、メチルエリスリトールを0.1%含むM9最少寒天培地では生育できるが、M9最少寒天培地では生育できない株を目的の変異株として選択した。

【0088】

該選択により得られたメチルエリスリトール要求性変異株ME 7株を以下の実験に用いた。

② メチルエリスリトール要求性相補遺伝子の取得

E. coli W3110株 (ATCC14948) をLB液体培地に植菌して対数増殖期まで培養した後、遠心分離して菌体を回収した。

【0089】

得られた菌体より、常法に従い染色体DNAを単離・精製した。

該染色体DNA 200 μ gを制限酵素Sau 3A Iで部分消化し、得られた消化DNA断片を、シュークロス密度勾配超遠心分離 (26,000 rpm、20℃、20 hr) により、サイズ分画した。

該分画により取得された大きさが4~6 kbのDNA断片を、制限酵素Bam HIで消化したベクターpMW118 (ニッポンジーン社製) にライゲーションすることにより染色体ゲノムライブラリーを作製した。

【0090】

作製した染色体ライブラリーを用い、上記①で分離されたME 7株を常法に従い形質転換した。

得られた形質転換体を、アンピシリン100 μ g/1入れたLB寒天培地に塗

布し、37℃で一晩培養した。

該培養において生育してきた複数のコロニーからプラスミドを抽出して塩基配列を決定した。

【0091】

塩基配列を決定したクローンは配列番号10に示される塩基配列を含む配列を有していた。

該配列を有するクローンの1株より抽出したプラスミドをpMEW73と命名した。

pMEW73をH i n d IIIおよびS a c Iで二重消化し、得られた配列番号10に示される塩基配列を有するH i n d III-S a c I処理DNA断片を広宿主域ベクター-pEG400 [J. Bac., 172, 2392 (1990)] のマルチクローニングサイトに連結してpEGYM1を作製した。

【0092】

上記H i n d III-S a c I処理DNA断片をベクターpUC19 [Gene, 33, 103 (1985)] のH i n d III-S a c I部位に連結してpUCYM-1を作製した。

Genbankのデータベースに基づく大腸菌の染色体塩基配列情報より、ベクターに挿入されたDNA断片はy a e M遺伝子を含むことが分かった。

y a e M遺伝子を十分発現させるような組換え体ベクターをPCR法 [Science, 230, 1350 (1985)] 用いて下記方法により構築した。

【0093】

配列番号20に示した配列を有するセンスプライマーおよび配列番号21に示した配列を有するアンチセンスプライマーをDNA合成機を用いて合成した。

該センスプライマーおよびアンチセンスプライマーの5'末端にはそれぞれB a m H Iの制限酵素サイトを付加させた。

染色体DNAを鋳型として、これらプライマーおよびTaq DNA polymerase (Boehringer社製) を用い、DNA Thermal Cycler (パーキンエルマージャパン社製) でPCRを行うことによりy a e M遺伝子を増幅した。

【0094】

PCRは、94℃で30秒間、55℃で30秒間、72℃で2分間からなる反応工程を1サイクルと30サイクル行った後、72℃で7分間反応させる条件で

行った。

増幅されたDNA断片およびpUC118（宝酒造社製）を制限酵素 B a m H I で消化後、各々のDNA断片をアガロースゲル電気泳動によって精製した。

【0095】

これら精製された両断片を混合した後エタノール沈殿を行い、得られたDNA沈殿物を5 μ lの蒸留水に溶解し、ライゲーション反応を行うことにより組換え体DNAを取得した。

該組換え体DNAがy a e M遺伝子であることをDNA配列を決定することによって確認した後、発現ベクター p Q E 3 0 (Qiagen社製)にサブクローニングした。

【0096】

得られた組換え体DNAをp Q E Y M 1と命名した。

p Q E Y M 1を用いて、ME 7株を常法に従って形質転換後、該形質転換体をアンピシリン100 μ g / m lを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩培養した。

該形質転換株は、野生型株と同程度の生育速度でコロニーを形成することが確認されたことより、y a e M遺伝子によりME 7株の変異が相補されることが分かった。

【0097】

実施例2 組換え大腸菌によるユビキノーン8 (C o Q 8) の生産

(1) 実施例1で取得したプラスミドp A D O - 1、p D X S - 1、p X S E - 1またはコントロールとしてp E G 4 0 0をE. coli DH5 α 株にそれぞれ導入し、100 μ g / m l濃度のスペクチノマイシンに抵抗性を示す形質転換体E. coli DH5 α / p A D O - 1、E. coli DH5 α / p D X S - 1、E. coli DH5 α / p X S E - 1およびE. coli DH5 α / p E G 4 0 0を各々取得した。

【0098】

チアミン (thiamine) とビタミンB₆をそれぞれ100 m g / l、p-ヒドロキシ安息香酸 50 m g / l、スペクチノマイシン 100 μ g / m l添加したLB培地を10 m l入れた試験管にこれら形質転換体を植菌し、30℃で72時間振

盪培養した。

培養終了後、各々の培養液を10倍濃縮した。

【0099】

各々の濃縮液300 μ lに2-ブタノール300 μ lおよびガラスビーズ300 μ lを加え、マルチビーズショッカーMB-200（安井器械社製）で5分間菌体破碎しつつ、イソプレノイド化合物の溶媒抽出を行った後、遠心分離により2-ブタノール層を採取した。

該ブタノール層中のCoQ8を、高速液体クロマトグラフィー（LC-10A 島津製作所製）で定量分析することにより、形質転換体によるCoQ8の生産量を算定した。

【0100】

カラムはDevelosil ODS-HG-5（野村化学）を用い、メタノール：n-ヘキサン＝8：2の溶液を移動相とし、流速1ml/min、測定波長275nmの条件で分析した。

結果を第1表に示す。

【0101】

【表1】

第1表 大腸菌形質転換株のCoQ8生産

形質転換株	生育量 [OD660]	CoQ8生産量 [mg/L]	菌体内含量 ^{*1}
<u>E. coli</u> DH5 α /pEG400	5.8	0.63	1.1
<u>E. coli</u> DH5 α /pAD0-1	5.5	0.98	1.8
<u>E. coli</u> DH5 α /pDXS-1	5.2	0.85	1.6
<u>E. coli</u> DH5 α /pXSE-1	5.6	0.67	1.2

*1：菌体内含量はCoQ8生産量[mg/L]を10倍した値を生育量[OD660]で割った値で示した。

CoQ8の生成量は、コントロール株DH5 α /pEG400と比較し、DH5 α /pAD0-1、DH5 α /pDXS-1およびDH5 α /pXSE-1では有意に高かった。特に、実施例1で取得したDNAを全て導入したDH5 α /pAD0-1において最も高い生産性が得られた

(2) M9 培地を 10 ml 入れた試験管に、上記 (1) で取得した *E. coli* DH5 α /pDXS-1 または *E. coli* DH5 α /pEG400 をそれぞれ植菌し、30℃で72時間振盪培養した。

【0102】

培養終了後、上記 (1) と同様の方法により形質転換体による CoQ8 の生産量を算定した。

結果を第2表に示す。

【0103】

【表2】

第2表 大腸菌形質転換株の CoQ8 生産

形質転換株	生育量 [OD660]	CoQ8生産量 [mg/L]	菌体内含量 ^{*1}
<i>E. coli</i> DH5 α /pEG400	3.1	0.49	1.6
<i>E. coli</i> DH5 α /pDXS-1	2.5	1.02	4.1

*1 : 菌体内含量は CoQ8 生産量 [mg/L] を 10 倍した値を生育量 [OD660] で割った値で示した。

CoQ8 の生成量は、コントロール株 DH5 α /pEG400 と比較し、DH5 α /pDXS-1 では有意に高かった。

【0104】

(3) 組換え大腸菌による CoQ8 の生産

実施例1で取得したプラスミド pEGYM1 またはコントロールとして pEG400 を *E. coli* DH5 α 株に導入し、100 μ g/ml 濃度のスペクチノマイシンに抵抗性を示す形質転換体 *E. coli* DH5 α /pEGYM1 および *E. coli* DH5 α /pEG400 を各々取得した。

【0105】

グルコース 1%、ビタミン B₁ 100 mg/l、ビタミン B₆ 100 mg/l、p-ハイドロキシ安息香酸 50 mg/l 添加した LB 培地を 10 ml 入れた試験管にこれら形質転換体を植菌し、30℃で72時間振盪培養した。

培養終了後、上記（１）と同様の方法により形質転換体によるC o Q 8の生産量を算定した。

【0106】

結果を第3表に示す。

【0107】

【表3】

第3表 大腸菌形質転換株のCoQ8生産

形質転換株	生育量 [OD660]	CoQ8生産量 [mg/L]	菌体内含量 ^{*1}
<u>E. coli</u> DH5 α /pEG400	14.44	0.83	0.57
<u>E. coli</u> DH5 α /pEGYM1	13.12	0.94	0.71

* 1 : 菌体内含量はC o Q 8生産量[mg/L]を10倍した値を生育量[OD660]で割った値で示した。

C o Q 8の生成量は、コントロール株DH5 α /pEG400と比較し、DH5 α /pEGYM1では有意に高かった。

【0108】

実施例3 組換え大腸菌によるメナキノーン8 (MK-8)の生産

(1) スペクチノマイシンを100 μ g/ml添加したTB培地〔バクトトリプトン(ディフコ社製) 12g、酵母エキス(ディフコ社製) 24g、グリセロール 5gを水900ml溶解し、KH₂PO₄を0.17M、K₂HPO₄を0.72M含有する水溶液を100ml加えて調製した培地〕を10ml入れた試験管に、実施例2(1)で取得した、E. coli DH5 α /pAD0-1またはE. coli DH5 α /pEG400をそれぞれ植菌し、30℃で72時間振盪培養した。

【0109】

培養終了後、実施例2(1)のC o Q 8の定量法と同様の方法によりMK-8を定量し、形質転換体によるMK-8の生産量を算定した。

結果を第4表に示す。

【0110】

【表4】

第4表 大腸菌形質転換株のMK-8生産

形質転換株	生育量 [OD660]	MK-8生産量 [mg/L]	菌体内含量 ^{*1}
<i>E. coli</i> DH5 α /pEG400	23.2	1.1	0.46
<i>E. coli</i> DH5 α /pAD0-1	23.5	1.8	0.75

*1: 菌体内含量はC o Q 8生産量[mg/L]を10倍した値を生育量[OD660]で割った値で示した。

MK-8の生産量は、コントロール株DH5 α /pEG400と比較して、DH5 α /pAD0-1では有意に高かった。

(2) 実施例2(1)で取得した*E. coli* DH5 α /pDXS-1または*E. coli* DH5 α /pEG400を、上記(1)と同様の方法で培養し、形質転換体によるMK-8の生産量を算定した。

【0111】

結果を第5表に示す。

【0112】

【表5】

第5表 大腸菌形質転換株のMK-8生産

形質転換株	生育量 [OD660]	MK-8生産量 [mg/L]	菌体内含量 ^{*1}
<i>E. coli</i> DH5 α /pEG400	42.8	2.41	0.56
<i>E. coli</i> DH5 α /pDXS-1	44.0	2.96	0.67

*1: 菌体内含量はC o Q 8生産量[mg/L]を10倍した値を生育量[OD660]で割った値で示した。

MK-8の生産量は、コントロール株DH5 α /pEG400と比較して、DH5 α /pDXS-1では有意に高かった。

【0113】

実施例4 *Erwinia carotovora*によるC o Q 8の生産

実施例1で取得したプラスミドpDXS-1またはコントロールとしてpEG400をErwinia carotovora IF0-3380株に導入し、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度のスペクチノマイシンに抵抗性を示す形質転換体IF0-3380/pDXS-1およびIF0-3380/pEG400を取得した。

【0114】

スペクチノマイシンを $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加したLB培地を10ml入れた試験管にこれら形質転換体を植菌し、 30°C で72時間振盪培養した。

培養終了後、実施例2(1)と同様の方法により形質転換体によるCoQ8の生産量を算定した。

結果を第6表に示す。

【0115】

【表6】

第6表 Erwinia carotovora 形質転換株によるCoQ8生産

形質転換株	生育量 OD660	CoQ8生産量 mg/L	菌体内含量 ^{*1}
IF0-3380/pEG400	1.68	0.26	1.5
IF0-3380/pDXS-1	2.48	0.45	1.8

*1: 菌体内含量はCoQ8生産量[mg/L]を10倍した値を生育量[OD660]で割った値で示した。

CoQ8の生成量は、コントロール株IF0-3380/pEG400と比較し、IF0-3380/pDXS-1では有意に高かった。

【0116】

実施例5: Erwinia uredovoraによるユビキノンおよびカロテノイドの生産

実施例1で取得したプラスミドpUCYM-1、pQEDXS-1、pQEYM-1またはコントロールとしてpUC19およびpQE30をエレクトロポレーション法によりErwinia. uredovora DSM-30080株に導入し、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度のアンピシリンに抵抗性を示す形質転換体E. uredovora DSM-30080/pUCYM-1、E. uredovora DSM-30080/pQEDXS-1、E. uredovora DSM-30080/pQEYM-1、E. uredovora DSM-30080/pUC19およびE. uredovora DSM-30080/pQE30を取得した。

【0117】

アンピシリン 100 μ g/ml、グルコース1%、ビタミンB₁ 100 mg/l、ビタミンB₆ 100 mg/l、p-ハイドロキシ安息香酸 50 mg/l 添加したLB培地を10 ml入れた試験管にこれら形質転換体を植菌し、30℃で72時間振盪培養した。

培養終了後、実施例2(1)と同様の方法により形質転換体によるC_oQ₈の生産量を算定した。

【0118】

カロテノイド色素の生産量は、実施例2(1)と同様の方法により得られた2-ブタノール層を分光光度計を用い、450 nmの吸光度を測定することにより算出した。

結果を第7表に示す。

【0119】

【表7】

第7表 E. uredo vora 形質転換株によるC_oQ₈およびカロテノイド生産

形質転換株	生育量 OD660	CoQ8		カロテノイド	
		生産量 mg/L	菌体内含量比 相対値	生産量 相対値	菌体内含量比 相対値
DSM-30080/pUC19	2.00	1.15	1.0	1.0	1.0
DSM-30080/pUCYM-1	1.88	1.39	1.3	1.5	1.6
DSM-30080/pQE30	2.52	1.29	1.0	1.0	1.0
DSM-30080/pQEYM-1	1.92	1.36	1.4	1.7	2.2
DSM-30080/pQEDXS-1	2.12	3.21	3.0	5.6	6.7

C_oQ₈の生産量およびカロテノイド色素の生産量ともに、コントロール株DSM-30080/pUC19と比較し、DSM-30080/pUCYM-1では有意に高かった。

同様に、C_oQ₈の生産量およびカロテノイド色素の生産量ともに、コントロール株DSM-30080/pQE30と比較し、DSM-30080/pQEYM-1およびDSM-30080/pQEDXS-1では有意に高かった。

【0120】

【発明の効果】

本発明によれば、心疾患、骨粗鬆症、止血、がん予防、免疫賦活等を目的とした医薬品、健康食品および貝類付着防止塗料等に有用なイソプレノイド化合物の生合成に関与するDNAを1つ以上含むDNAをベクターに組み込み、得られた組換え体DNAを原核生物由来の宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培地に培養し、培養物中にイソプレノイド化合物を生成蓄積させ、該培養物からイソプレノイド化合物を採取することを特徴とする、イソプレノイド化合物の製造法、イソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質をコードするDNAを1つ以上含むDNAをベクターに組み込み、得られた組換え体DNAを宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培地に培養し、培養物中に該蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする、該蛋白質の製造法、および該蛋白質を提供することができる。

【0121】

特平 10-103101

【配列表】

【0122】

配列番号：1

配列の長さ：620

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：Escherichia coli

株名：XL1-Blue

配列

Met Ser Phe Asp Ile Ala Lys Tyr Pro Thr Leu Ala Leu Val Asp Ser

1

5

10

15

Thr Gln Glu Leu Arg Leu Leu Pro Lys Glu Ser Leu Pro Lys Leu Cys

20

25

30

Asp Glu Leu Arg Arg Tyr Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Ser Ser Gly

35

40

45

His Phe Ala Ser Gly Leu Gly Thr Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His

50

55

60

Tyr Val Tyr Asn Thr Pro Phe Asp Gln Leu Ile Trp Asp Val Gly His

65

70

75

80

Gln Ala Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Ile Gly

85

90

95

Thr Ile Arg Gln Lys Gly Gly Leu His Pro Phe Pro Trp Arg Gly Glu

100

105

110

Ser Glu Tyr Asp Val Leu Ser Val Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser

115

120

125

Ala Gly Ile Gly Ile Ala Val Ala Ala Glu Lys Glu Gly Lys Asn Arg

130

135

140

Arg Thr Val Cys Val	Ile Gly Asp Gly Ala	Ile Thr Ala Gly Met Ala
145	150	155 160
Phe Glu Ala Met Asn His Ala Gly Asp	Ile Arg Pro Asp Met Leu Val	
165	170 175	
Ile Leu Asn Asp Asn Glu Met Ser Ile Ser Glu Asn Val Gly Ala Leu		
180	185 190	
Asn Asn His Leu Ala Gln Leu Leu Ser Gly Lys Leu Tyr Ser Ser Leu		
195	200 205	
Arg Glu Gly Gly Lys Lys Val Phe Ser Gly Val Pro Pro Ile Lys Glu		
210	215 220	
Leu Leu Lys Arg Thr Glu Glu His Ile Lys Gly Met Val Val Pro Gly		
225	230 235 240	
Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Asn Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly		
245	250 255	
His Asp Val Leu Gly Leu Ile Thr Thr Leu Lys Asn Met Arg Asp Leu		
260	265 270	
Lys Gly Pro Gln Phe Leu His Ile Met Thr Lys Lys Gly Arg Gly Tyr		
275	280 285	
Glu Pro Ala Glu Lys Asp Pro Ile Thr Phe His Ala Val Pro Lys Phe		
290	295 300	
Asp Pro Ser Ser Gly Cys Leu Pro Lys Ser Ser Gly Gly Leu Pro Ser		
305	310 315 320	
Tyr Ser Lys Ile Phe Gly Asp Trp Leu Cys Glu Thr Ala Ala Lys Asp		
325	330 335	
Asn Lys Leu Met Ala Ile Thr Pro Ala Met Arg Glu Gly Ser Gly Met		
340	345 350	
Val Glu Phe Ser Arg Lys Phe Pro Asp Arg Tyr Phe Asp Val Ala Ile		
355	360 365	
Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Ile Gly Gly		

特平 10-103101

370	375	380
Tyr Lys Pro Ile Val Ala Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Ala Tyr		
385	390	395
Asp Gln Val Leu His Asp Val Ala Ile Gln Lys Leu Pro Val Leu Phe		400
405	410	415
Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ile Val Gly Ala Asp Gly Gln Thr His Gln		
420	425	430
Gly Ala Phe Asp Leu Ser Tyr Leu Arg Cys Ile Pro Glu Met Val Ile		
435	440	445
Met Thr Pro Ser Asp Glu Asn Glu Cys Arg Gln Met Leu Tyr Thr Gly		
450	455	460
Tyr His Tyr Asn Asp Gly Pro Ser Ala Val Arg Tyr Pro Arg Gly Asn		
465	470	475
Ala Val Gly Val Glu Leu Thr Pro Leu Glu Lys Leu Pro Ile Gly Lys		480
485	490	495
Gly Ile Val Lys Arg Arg Gly Glu Lys Leu Ala Ile Leu Asn Phe Gly		
500	505	510
Thr Leu Met Pro Glu Ala Ala Lys Val Ala Glu Ser Leu Asn Ala Thr		
515	520	525
Leu Val Asp Met Arg Phe Val Lys Pro Leu Asp Glu Ala Leu Ile Leu		
530	535	540
Glu Met Ala Ala Ser His Glu Ala Leu Val Thr Val Glu Glu Asn Ala		
545	550	555
Ile Met Gly Gly Ala Gly Ser Gly Val Asn Glu Val Leu Met Ala His		
565	570	575
Arg Lys Pro Val Pro Val Leu Asn Ile Gly Leu Pro Asp Phe Phe Ile		
580	585	590
Pro Gln Gly Thr Gln Glu Glu Met Arg Ala Glu Leu Gly Leu Asp Ala		
595	600	605

Ala Gly Met Glu Ala Lys Ile Lys Ala Trp Leu Ala

610

615

620

【0123】

配列番号：2

配列の長さ：299

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：Escherichia coli

株名：XL1-Blue

配列

Met Asp Phe Pro Gln Gln Leu Glu Ala Cys Val Lys Gln Ala Asn Gln

1

5

10

15

Ala Leu Ser Arg Phe Ile Ala Pro Leu Pro Phe Gln Asn Thr Pro Val

20

25

30

Val Glu Thr Met Gln Tyr Gly Ala Leu Leu Gly Gly Lys Arg Leu Arg

35

40

45

Pro Phe Leu Val Tyr Ala Thr Gly His Met Phe Gly Val Ser Thr Asn

50

55

60

Thr Leu Asp Ala Pro Ala Ala Ala Val Glu Cys Ile His Ala Tyr Ser

65

70

75

80

Leu Ile His Asp Asp Leu Pro Ala Met Asp Asp Asp Asp Leu Arg Arg

85

90

95

Gly Leu Pro Thr Cys His Val Lys Phe Gly Glu Ala Asn Ala Ile Leu

100

105

110

Ala Gly Asp Ala Leu Gln Thr Leu Ala Phe Ser Ile Leu Ser Asp Ala

115

120

125

Asp Met Pro Glu Val Ser Asp Arg Asp Arg Ile Ser Met Ile Ser Glu

特平 10-103101

130	135	140	
Leu Ala Ser Ala Ser Gly Ile Ala Gly Met Cys Gly Gly Gln Ala Leu			
145	150	155	160
Asp Leu Asp Ala Glu Gly Lys His Val Pro Leu Asp Ala Leu Glu Arg			
165	170	175	
Ile His Arg His Lys Thr Gly Ala Leu Ile Arg Ala Ala Val Arg Leu			
180	185	190	
Gly Ala Leu Ser Ala Gly Asp Lys Gly Arg Arg Ala Leu Pro Val Leu			
195	200	205	
Asp Lys Tyr Ala Glu Ser Ile Gly Leu Ala Phe Gln Val Gln Asp Asp			
210	215	220	
Ile Leu Asp Val Val Gly Asp Thr Ala Thr Leu Gly Lys Arg Gln Gly			
225	230	235	240
Ala Asp Gln Gln Leu Gly Lys Ser Thr Tyr Pro Ala Leu Leu Gly Leu			
245	250	255	
Glu Gln Ala Arg Lys Lys Ala Arg Asp Leu Ile Asp Asp Ala Arg Gln			
260	265	270	
Ser Leu Lys Gln Leu Ala Glu Gln Ser Leu Asp Thr Ser Ala Leu Glu			
275	280	285	
Ala Leu Ala Asp Tyr Ile Ile Gln Arg Asn Lys			
290	295		

【0124】

配列番号：3

配列の長さ：80

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：Escherichia coli

株名 : XL1-Blue

配列

```

Met Pro Lys Lys Asn Glu Ala Pro Ala Ser Phe Glu Lys Ala Leu Ser
 1           5           10           15
Glu Leu Glu Gln Ile Val Thr Arg Leu Glu Ser Gly Asp Leu Pro Leu
          20           25           30
Glu Glu Ala Leu Asn Glu Phe Glu Arg Gly Val Gln Leu Ala Arg Gln
          35           40           45
Gly Gln Ala Lys Leu Gln Gln Ala Glu Gln Arg Val Gln Ile Leu Leu
          50           55           60
Ser Asp Asn Glu Asp Ala Ser Leu Thr Pro Phe Thr Pro Asp Asn Glu
 65           70           75           80

```

【0125】

配列番号 : 4

配列の長さ : 348

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

生物名 : Escherichia coli

株名 : XL1-Blue

配列

```

Val Thr Gly Val Asn Glu Cys Ser Arg Ser Thr Cys Asn Leu Lys Tyr
 1           5           10           15
Asp Glu Tyr Ser Arg Ser Gly Ser Met Gln Tyr Asn Pro Leu Gly Lys
          20           25           30
Thr Asp Leu Arg Val Ser Arg Leu Cys Leu Gly Cys Met Thr Phe Gly
          35           40           45
Glu Pro Asp Arg Gly Asn His Ala Trp Thr Leu Pro Glu Glu Ser Ser

```

特平 10—103101

50	55	60
Arg Pro Ile Ile Lys Arg Ala Leu Glu Gly Gly Ile Asn Phe Phe Asp		
65	70	75
Thr Ala Asn Ser Tyr Ser Asp Gly Ser Ser Glu Glu Ile Val Gly Arg		80
	85	90
Ala Leu Arg Asp Phe Ala Arg Arg Glu Asp Val Val Val Ala Thr Lys		95
100	105	110
Val Phe His Arg Val Gly Asp Leu Pro Glu Gly Leu Ser Arg Ala Gln		
115	120	125
Ile Leu Arg Ser Ile Asp Asp Ser Leu Arg Arg Leu Gly Met Asp Tyr		
130	135	140
Val Asp Ile Leu Gln Ile His Arg Trp Asp Tyr Asn Thr Pro Ile Glu		
145	150	155
Glu Thr Leu Glu Ala Leu Asn Asp Val Val Lys Ala Gly Lys Ala Arg		160
	165	170
Tyr Ile Gly Ala Ser Ser Met His Ala Ser Gln Phe Ala Gln Ala Leu		
180	185	190
Glu Leu Gln Lys Gln His Gly Trp Ala Gln Phe Val Ser Met Gln Asp		
195	200	205
His Tyr Asn Leu Ile Tyr Arg Glu Glu Glu Arg Glu Met Leu Pro Leu		
210	215	220
Cys Tyr Gln Glu Gly Val Ala Val Ile Pro Trp Ser Pro Leu Ala Arg		
225	230	235
Gly Arg Leu Thr Arg Pro Trp Gly Glu Thr Thr Ala Arg Leu Val Ser		240
	245	250
Asp Glu Val Gly Lys Asn Leu Tyr Lys Glu Ser Asp Glu Asn Asp Ala		255
260	265	270
Gln Ile Ala Glu Arg Leu Thr Gly Val Ser Glu Glu Leu Gly Ala Thr		
275	280	285

Arg Ala Gln Val Ala Leu Ala Trp Leu Leu Ser Lys Pro Gly Ile Ala
 290 295 300
 Ala Pro Ile Ile Gly Thr Ser Arg Glu Glu Gln Leu Asp Glu Leu Leu
 305 310 315 320
 Asn Ala Val Asp Ile Thr Leu Lys Pro Glu Gln Ile Ala Glu Leu Glu
 325 330 335
 Thr Pro Tyr Lys Pro His Pro Val Val Gly Phe Lys
 340 345

【0126】

配列番号：5

配列の長さ：398

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：Escherichia coli

株名：W3110

配列

Met Lys Gln Leu Thr Ile Leu Gly Ser Thr Gly Ser Ile Gly Cys Ser
 1 5 10 15
 Thr Leu Asp Val Val Arg His Asn Pro Glu His Phe Arg Val Val Ala
 20 25 30
 Leu Val Ala Gly Lys Asn Val Thr Arg Met Val Glu Gln Cys Leu Glu
 35 40 45
 Phe Ser Pro Arg Tyr Ala Val Met Asp Asp Glu Ala Ser Ala Lys Leu
 50 55 60
 Leu Lys Thr Met Leu Gln Gln Gln Gly Ser Arg Thr Glu Val Leu Ser
 65 70 75 80
 Gly Gln Gln Ala Ala Cys Asp Met Ala Ala Leu Glu Asp Val Asp Gln

特平 1 0 — 1 0 3 1 0 1

	85		90		95
Val Met Ala Ala Ile Val Gly Ala Ala Gly Leu Leu Pro Thr Leu Ala					
100		105		110	
Ala Ile Arg Ala Gly Lys Thr Ile Leu Leu Ala Asn Lys Glu Ser Leu					
115		120		125	
Val Thr Cys Gly Arg Leu Phe Met Asp Ala Val Lys Gln Ser Lys Ala					
130		135		140	
Gln Leu Leu Pro Val Asp Ser Glu His Asn Ala Ile Phe Gln Ser Leu					
145		150		155	160
Pro Gln Pro Ile Gln His Asn Leu Gly Tyr Ala Asp Leu Glu Gln Asn					
165		170		175	
Gly Val Val Ser Ile Leu Leu Thr Gly Ser Gly Gly Pro Phe Arg Glu					
180		185		190	
Thr Pro Leu Arg Asp Leu Ala Thr Met Thr Pro Asp Gln Ala Cys Arg					
195		200		205	
His Pro Asn Trp Ser Met Gly Arg Lys Ile Ser Val Asp Ser Ala Thr					

210	215	220
Met Met Asn Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Glu Ala Arg Trp Leu Phe Asn		
225	230	235
Ala Ser Ala Ser Gln Met Glu Val Leu Ile His Pro Gln Ser Val Ile		
245	250	255
His Ser Met Val Arg Tyr Gln Asp Gly Ser Val Leu Ala Gln Leu Gly		
260	265	270
Glu Pro Asp Met Val Arg Gln Leu Pro Thr Pro Trp Ala Trp Pro Asn		
275	280	285
Arg Val Asn Ser Gly Val Lys Pro Leu Asp Phe Cys Lys Leu Ser Ala		
290	295	300
Leu Thr Phe Ala Ala Pro Asp Tyr Asp Arg Tyr Pro Cys Leu Lys Leu		
305	310	315
Ala Met Glu Ala Phe Glu Gln Gly Gln Ala Ala Thr Thr Ala Leu Asn		
325	330	335
Ala Ala Asn Glu Ile Thr Val Ala Ala Phe Leu Ala Gln Gln Ile Arg		
340	345	350
Phe Thr Asp Ile Ala Ala Leu Asn Leu Ser Val Leu Glu Lys Met Asp		
355	360	365
Met Arg Glu Pro Gln Cys Val Asp Asp Val Leu Ser Val Asp Ala Asn		
370	375	380
Ala Arg Glu Val Ala Arg Lys Glu Val Met Arg Leu Ala Ser		
385	390	395

【 0 1 2 7 】

配列番号 : 6

配列の長さ : 1860

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源

生物名 : Escherichia coli

株名 : XL1-Blue

配列

ATG AGT TTT GAT ATT GCC AAA TAC CCG ACC CTG GCA CTG GTC GAC TCC	48
Met Ser Phe Asp Ile Ala Lys Tyr Pro Thr Leu Ala Leu Val Asp Ser	
1 5 10 15	
ACC CAG GAG TTA CGA CTG TTG CCG AAA GAG AGT TTA CCG AAA CTC TGC	96
Thr Gln Glu Leu Arg Leu Leu Pro Lys Glu Ser Leu Pro Lys Leu Cys	
20 25 30	
GAC GAA CTG CGC CGC TAT TTA CTC GAC AGC GTG AGC CGT TCC AGC GGG	144
Asp Glu Leu Arg Arg Tyr Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Ser Ser Gly	
35 40 45	
CAC TTC GCC TCC GGG CTG GGC ACG GTC GAA CTG ACC GTG GCG CTG CAC	192
His Phe Ala Ser Gly Leu Gly Thr Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His	
50 55 60	
TAT GTC TAC AAC ACC CCG TTT GAC CAA TTG ATT TGG GAT GTG GGG CAT	240
Tyr Val Tyr Asn Thr Pro Phe Asp Gln Leu Ile Trp Asp Val Gly His	
65 70 75 80	
CAG GCT TAT CCG CAT AAA ATT TTG ACC GGA CGC CGC GAC AAA ATC GGC	288
Gln Ala Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Ile Gly	
85 90 95	
ACC ATC CGT CAG AAA GGC GGT CTG CAC CCG TTC CCG TGG CGC GGC GAA	336
Thr Ile Arg Gln Lys Gly Gly Leu His Pro Phe Pro Trp Arg Gly Glu	
100 105 110	
AGC GAA TAT GAC GTA TTA AGC GTC GGG CAT TCA TCA ACC TCC ATC AGT	384
Ser Glu Tyr Asp Val Leu Ser Val Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser	
115 120 125	

GCC GGA ATT GGT ATT GCG GTT GCT GCC GAA AAA GAA GGC AAA AAT CGC	432
Ala Gly Ile Gly Ile Ala Val Ala Ala Glu Lys Glu Gly Lys Asn Arg	
130 135 140	
CGC ACC GTC TGT GTC ATT GGC GAT GGC GCG ATT ACC GCA GGC ATG GCG	480
Arg Thr Val Cys Val Ile Gly Asp Gly Ala Ile Thr Ala Gly Met Ala	
145 150 155 160	
TTT GAA GCG ATG AAT CAC GCG GGC GAT ATC CGT CCT GAT ATG CTG GTG	528
Phe Glu Ala Met Asn His Ala Gly Asp Ile Arg Pro Asp Met Leu Val	
165 170 175	
ATT CTC AAC GAC AAT GAA ATG TCG ATT TCC GAA AAT GTC GGC GCG CTC	576
Ile Leu Asn Asp Asn Glu Met Ser Ile Ser Glu Asn Val Gly Ala Leu	
180 185 190	
AAC AAC CAT CTG GCA CAG CTG CTT TCC GGT AAG CTT TAC TCT TCA CTG	624
Asn Asn His Leu Ala Gln Leu Leu Ser Gly Lys Leu Tyr Ser Ser Leu	
195 200 205	
CGC GAA GGC GGG AAA AAA GTT TTC TCT GGC GTG CCG CCA ATT AAA GAG	672
Arg Glu Gly Gly Lys Lys Val Phe Ser Gly Val Pro Pro Ile Lys Glu	
210 215 220	
CTG CTC AAA CGC ACC GAA GAA CAT ATT AAA GGC ATG GTA GTG CCT GGC	720
Leu Leu Lys Arg Thr Glu Glu His Ile Lys Gly Met Val Val Pro Gly	
225 230 235 240	
ACG TTG TTT GAA GAG CTG GGC TTT AAC TAC ATC GGC CCG GTG GAC GGT	768
Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Asn Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly	
245 250 255	
CAC GAT GTG CTG GGG CTT ATC ACC ACG CTA AAG AAC ATG CGC GAC CTG	816
His Asp Val Leu Gly Leu Ile Thr Thr Leu Lys Asn Met Arg Asp Leu	
260 265 270	
AAA GGC CCG CAG TTC CTG CAT ATC ATG ACC AAA AAA GGT CGT GGT TAT	864
Lys Gly Pro Gln Phe Leu His Ile Met Thr Lys Lys Gly Arg Gly Tyr	

特平 1 0 — 1 0 3 1 0 1

275	280	285	
GAA CCG GCA GAA AAA GAC CCG ATC ACT TTC CAC GCC GTG CCT AAA TTT			912
Glu Pro Ala Glu Lys Asp Pro Ile Thr Phe His Ala Val Pro Lys Phe			
290	295	300	
GAT CCC TCC AGC GGT TGT TTG CCG AAA AGT AGC GGC GGT TTG CCG AGC			960
Asp Pro Ser Ser Gly Cys Leu Pro Lys Ser Ser Gly Gly Leu Pro Ser			
305	310	315	320
TAT TCA AAA ATC TTT GGC GAC TGG TTG TGC GAA ACG GCA GCG AAA GAC			1008
Tyr Ser Lys Ile Phe Gly Asp Trp Leu Cys Glu Thr Ala Ala Lys Asp			
325	330	335	
AAC AAG CTG ATG GCG ATT ACT CCG GCG ATG CGT GAA GGT TCC GGC ATG			1056
Asn Lys Leu Met Ala Ile Thr Pro Ala Met Arg Glu Gly Ser Gly Met			
340	345	350	
GTC GAG TTT TCA CGT AAA TTC CCG GAT CGC TAC TTC GAC GTG GCA ATT			1104
Val Glu Phe Ser Arg Lys Phe Pro Asp Arg Tyr Phe Asp Val Ala Ile			
355	360	365	
GCC GAG CAA CAC GCG GTG ACC TTT GCT GCG GGT CTG GCG ATT GGT GGG			1152
Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Ile Gly Gly			
370	375	380	
TAC AAA CCC ATT GTC GCG ATT TAC TCC ACT TTC CTG CAA CGC GCC TAT			1200
Tyr Lys Pro Ile Val Ala Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Ala Tyr			
385	390	395	400
GAT CAG GTG CTG CAT GAC GTG GCG ATT CAA AAG CTT CCG GTC CTG TTC			1248
Asp Gln Val Leu His Asp Val Ala Ile Gln Lys Leu Pro Val Leu Phe			
405	410	415	
GCC ATC GAC CGC GCG GGC ATT GTT GGT GCT GAC GGT CAA ACC CAT CAG			1296
Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ile Val Gly Ala Asp Gly Gln Thr His Gln			
420	425	430	
GGT GCT TTT GAT CTC TCT TAC CTG CGC TGC ATA CCG GAA ATG GTC ATT			1344

Gly Ala Phe Asp Leu Ser Tyr Leu Arg Cys Ile Pro Glu Met Val Ile	
435	440
ATG ACC CCG AGC GAT GAA AAC GAA TGT CGC CAG ATG CTC TAT ACC GGC	1392
Met Thr Pro Ser Asp Glu Asn Glu Cys Arg Gln Met Leu Tyr Thr Gly	
450	455
TAT CAC TAT AAC GAT GGC CCG TCA GCG GTG CGC TAC CCG CGT GGC AAC	1440
Tyr His Tyr Asn Asp Gly Pro Ser Ala Val Arg Tyr Pro Arg Gly Asn	
465	470
GCG GTC GGC GTG GAA CTG ACG CCG CTG GAA AAA CTA CCA ATT GGC AAA	1488
Ala Val Gly Val Glu Leu Thr Pro Leu Glu Lys Leu Pro Ile Gly Lys	
485	490
GGC ATT GTG AAG CGT CGT GGC GAG AAA CTG GCG ATC CTT AAC TTT GGT	1536
Gly Ile Val Lys Arg Arg Gly Glu Lys Leu Ala Ile Leu Asn Phe Gly	
500	505
ACG CTG ATG CCA GAA GCG GCG AAA GTC GCC GAA TCG CTG AAC GCC ACG	1584
Thr Leu Met Pro Glu Ala Ala Lys Val Ala Glu Ser Leu Asn Ala Thr	
515	520
CTG GTC GAT ATG CGT TTT GTG AAA CCG CTT GAT GAA GCG TTA ATT CTG	1632
Leu Val Asp Met Arg Phe Val Lys Pro Leu Asp Glu Ala Leu Ile Leu	
530	535
GAA ATG GCC GCC AGC CAT GAA GCG CTG GTC ACC GTA GAA GAA AAC GCC	1680
Glu Met Ala Ala Ser His Glu Ala Leu Val Thr Val Glu Glu Asn Ala	
545	550
ATT ATG GGC GGC GCA GGC AGC GGC GTG AAC GAA GTG CTG ATG GCC CAT	1728
Ile Met Gly Gly Ala Gly Ser Gly Val Asn Glu Val Leu Met Ala His	
565	570
CGT AAA CCA GTA CCC GTG CTG AAC ATT GGC CTG CCG GAC TTC TTT ATT	1776
Arg Lys Pro Val Pro Val Leu Asn Ile Gly Leu Pro Asp Phe Phe Ile	
580	585
	590

特平 1 0 - 1 0 3 1 0 1

CCG CAA GGA ACT CAG GAA GAA ATG CGC GCC GAA CTC GGC CTC GAT GCC 1824
Pro Gln Gly Thr Gln Glu Glu Met Arg Ala Glu Leu Gly Leu Asp Ala

595

600

605

GCT GGT ATG GAA GCC AAA ATC AAG GCC TGG CTG GCA 1860
Ala Gly Met Glu Ala Lys Ile Lys Ala Trp Leu Ala

610

615

620

【0 1 2 8】

配列番号 : 7

配列の長さ : 897

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源

生物名 : Escherichia coli

株名 : XL1-Blue

配列

ATG GAC TTT CCG CAG CAA CTC GAA GCC TGC GTT AAG CAG GCC AAC CAG 48
Met Asp Phe Pro Gln Gln Leu Glu Ala Cys Val Lys Gln Ala Asn Gln

1

5

10

15

GCG CTG AGC CGT TTT ATC GCC CCA CTG CCC TTT CAG AAC ACT CCC GTG 96
Ala Leu Ser Arg Phe Ile Ala Pro Leu Pro Phe Gln Asn Thr Pro Val

20

25

30

GTC GAA ACC ATG CAG TAT GGC GCA TTA TTA GGT GGT AAG CGC CTG CGA 144
Val Glu Thr Met Gln Tyr Gly Ala Leu Leu Gly Gly Lys Arg Leu Arg

35

40

45

CCT TTC CTG GTT TAT GCC ACC GGT CAT ATG TTC GGC GTT AGC ACA AAC 192
Pro Phe Leu Val Tyr Ala Thr Gly His Met Phe Gly Val Ser Thr Asn

50

55

60

ACG CTG GAC GCA CCC GCT GCC GCC GTT GAG TGT ATC CAC GCT TAC TCA	240
Thr Leu Asp Ala Pro Ala Ala Ala Val Glu Cys Ile His Ala Tyr Ser	
65 70 75 80	
TTA ATT CAT GAT GAT TTA CCG GCA ATG GAT GAT GAC GAT CTG CGT CGC	288
Leu Ile His Asp Asp Leu Pro Ala Met Asp Asp Asp Asp Leu Arg Arg	
85 90 95	
GGT TTG CCA ACC TGC CAT GTG AAG TTT GGC GAA GCA AAC GCG ATT CTC	336
Gly Leu Pro Thr Cys His Val Lys Phe Gly Glu Ala Asn Ala Ile Leu	
100 105 110	
GCT GGC GAC GCT TTA CAA ACG CTG GCG TTC TCG ATT TTA AGC GAT GCC	384
Ala Gly Asp Ala Leu Gln Thr Leu Ala Phe Ser Ile Leu Ser Asp Ala	
115 120 125	
GAT ATG CCG GAA GTG TCG GAC CGC GAC AGA ATT TCG ATG ATT TCT GAA	432
Asp Met Pro Glu Val Ser Asp Arg Asp Arg Ile Ser Met Ile Ser Glu	
130 135 140	
CTG GCG AGC GCC AGT GGT ATT GCC GGA ATG TGC GGT GGT CAG GCA TTA	480
Leu Ala Ser Ala Ser Gly Ile Ala Gly Met Cys Gly Gly Gln Ala Leu	
145 150 155 160	
GAT TTA GAC GCG GAA GGC AAA CAC GTA CCT CTG GAC GCG CTT GAG CGT	528
Asp Leu Asp Ala Glu Gly Lys His Val Pro Leu Asp Ala Leu Glu Arg	
165 170 175	
ATT CAT CGT CAT AAA ACC GGC GCA TTG ATT CGC GCC GCC GTT CGC CTT	576
Ile His Arg His Lys Thr Gly Ala Leu Ile Arg Ala Ala Val Arg Leu	
180 185 190	
GGT GCA TTA AGC GCC GGA GAT AAA GGA CGT CGT GCT CTG CCG GTA CTC	624
Gly Ala Leu Ser Ala Gly Asp Lys Gly Arg Arg Ala Leu Pro Val Leu	
195 200 205	
GAC AAG TAT GCA GAG AGC ATC GGC CTT GCC TTC CAG GTT CAG GAT GAC	672
Asp Lys Tyr Ala Glu Ser Ile Gly Leu Ala Phe Gln Val Gln Asp Asp	

特平 1 0 - 1 0 3 1 0 1

210	215	220	
ATC CTG GAT GTG GTG GGA GAT ACT GCA ACG TTG GGA AAA CGC CAG GGT			720
Ile Leu Asp Val Val Gly Asp Thr Ala Thr Leu Gly Lys Arg Gln Gly			
225	230	235	240
GCC GAC CAG CAA CTT GGT AAA AGT ACC TAC CCT GCA CTT CTG GGT CTT			768
Ala Asp Gln Gln Leu Gly Lys Ser Thr Tyr Pro Ala Leu Leu Gly Leu			
245	250	255	
GAG CAA GCC CGG AAG AAA GCC CGG GAT CTG ATC GAC GAT GCC CGT CAG			816
Glu Gln Ala Arg Lys Lys Ala Arg Asp Leu Ile Asp Asp Ala Arg Gln			
260	265	270	
TCG CTG AAA CAA CTG GCT GAA CAG TCA CTC GAT ACC TCG GCA CTG GAA			864
Ser Leu Lys Gln Leu Ala Glu Gln Ser Leu Asp Thr Ser Ala Leu Glu			
275	280	285	
GCG CTA GCG GAC TAC ATC ATC CAG CGT AAT AAA			897
Ala Leu Ala Asp Tyr Ile Ile Gln Arg Asn Lys			

【 0 1 2 9 】

配列番号 : 8

配列の長さ : 240

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源

生物名 : Escherichia coli

株名 : XL1-Blue

配列

ATG CCG AAG AAA AAT GAG GCG CCC GCC AGC TTT GAA AAG GCG CTG AGC	48
Met Pro Lys Lys Asn Glu Ala Pro Ala Ser Phe Glu Lys Ala Leu Ser	

1	5	10	15	
GAG CTG GAA CAG ATT GTA ACC CGT CTG GAA AGT GGC GAC CTG CCG CTG				96
Glu Leu Glu Gln Ile Val Thr Arg Leu Glu Ser Gly Asp Leu Pro Leu				
20	25	30		
GAA GAG GCG CTG AAC GAG TTC GAA CGC GGC GTG CAG CTG GCA CGT CAG				144
Glu Glu Ala Leu Asn Glu Phe Glu Arg Gly Val Gln Leu Ala Arg Gln				
35	40	45		
GGG CAG GCC AAA TTA CAA CAA GCC GAA CAG CGC GTA CAA ATT CTG CTG				192
Gly Gln Ala Lys Leu Gln Gln Ala Glu Gln Arg Val Gln Ile Leu Leu				
50	55	60		
TCT GAC AAT GAA GAC GCC TCT CTA ACC CCT TTT ACA CCG GAC AAT GAG				240
Ser Asp Asn Glu Asp Ala Ser Leu Thr Pro Phe Thr Pro Asp Asn Glu				
65	70	75	80	

【0130】

配列番号 : 9

配列の長さ : 1044

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源

生物名 : Escherichia coli

株名 : XL1-Blue

配列

GTG ACT GGG GTG AAC GAA TGC AGC CGC AGC ACA TGC AAC TTG AAG TAT	48			
Val Thr Gly Val Asn Glu Cys Ser Arg Ser Thr Cys Asn Leu Lys Tyr				
1	5	10	15	
GAC GAG TAT AGC AGG AGT GGC AGC ATG CAA TAC AAC CCC TTA GGA AAA	96			
Asp Glu Tyr Ser Arg Ser Gly Ser Met Gln Tyr Asn Pro Leu Gly Lys				

特平 1 0 — 1 0 3 1 0 1

20	25	30	
ACC GAC CTT CGC GTT TCC CGA CTT TGC CTC GGC TGT ATG ACC TTT GGC			144
Thr Asp Leu Arg Val Ser Arg Leu Cys Leu Gly Cys Met Thr Phe Gly			
35	40	45	
GAG CCA GAT CGC GGT AAT CAC GCA TGG ACA CTG CCG GAA GAA AGC AGC			192
Glu Pro Asp Arg Gly Asn His Ala Trp Thr Leu Pro Glu Glu Ser Ser			
50	55	60	
CGT CCC ATA ATT AAA CGT GCA CTG GAA GGC GGC ATA AAT TTC TTT GAT			240
Arg Pro Ile Ile Lys Arg Ala Leu Glu Gly Gly Ile Asn Phe Phe Asp			
65	70	75	80
ACC GCC AAC AGT TAT TCT GAC GGC AGC AGC GAA GAG ATC GTC GGT CGC			288
Thr Ala Asn Ser Tyr Ser Asp Gly Ser Ser Glu Glu Ile Val Gly Arg			
85	90	95	
GCA CTG CGG GAT TTC GCC CGT CGT GAA GAC GTG GTC GTT GCG ACC AAA			336
Ala Leu Arg Asp Phe Ala Arg Arg Glu Asp Val Val Val Ala Thr Lys			
100	105	110	
GTG TTC CAT CGC GTT GGT GAT TTA CCG GAA GGA TTA TCC CGT GCG CAA			384
Val Phe His Arg Val Gly Asp Leu Pro Glu Gly Leu Ser Arg Ala Gln			
115	120	125	
ATT TTG CGC TCT ATC GAC GAC AGC CTG CGA CGT CTC GGC ATG GAT TAT			432
Ile Leu Arg Ser Ile Asp Asp Ser Leu Arg Arg Leu Gly Met Asp Tyr			
130	135	140	
GTC GAT ATC CTG CAA ATT CAT CGC TGG GAT TAC AAC ACG CCG ATC GAA			480
Val Asp Ile Leu Gln Ile His Arg Trp Asp Tyr Asn Thr Pro Ile Glu			
145	150	155	160
GAG ACG CTG GAA GCC CTC AAC GAC GTG GTA AAA GCC GGG AAA GCG CGT			528
Glu Thr Leu Glu Ala Leu Asn Asp Val Val Lys Ala Gly Lys Ala Arg			
165	170	175	
TAT ATC GGC GCG TCA TCA ATG CAC GCT TCG CAG TTT GCT CAG GCA CTG			576

Tyr Ile Gly Ala Ser Ser Met His Ala Ser Gln Phe Ala Gln Ala Leu	
180 185 190	
GAA CTC CAA AAA CAG CAC GGC TGG GCG CAG TTT GTC AGT ATG CAG GAT	624
Glu Leu Gln Lys Gln His Gly Trp Ala Gln Phe Val Ser Met Gln Asp	
195 200 205	
CAC TAC AAT CTG ATT TAT CGT GAA GAA GAG CGC GAG ATG CTA CCA CTG	672
His Tyr Asn Leu Ile Tyr Arg Glu Glu Glu Arg Glu Met Leu Pro Leu	
210 215 220	
TGT TAT CAG GAG GGC GTG GCG GTA ATT CCA TGG AGC CCG CTG GCA AGG	720
Cys Tyr Gln Glu Gly Val Ala Val Ile Pro Trp Ser Pro Leu Ala Arg	
225 230 235 240	
GGC CGT CTG ACG CGT CCG TGG GGA GAA ACT ACC GCA CGA CTG GTG TCT	768
Gly Arg Leu Thr Arg Pro Trp Gly Glu Thr Thr Ala Arg Leu Val Ser	
245 250 255	
GAT GAG GTG GGG AAA AAT CTC TAT AAA GAA AGC GAT GAA AAT GAC GCG	816
Asp Glu Val Gly Lys Asn Leu Tyr Lys Glu Ser Asp Glu Asn Asp Ala	
260 265 270	
CAG ATC GCA GAG CGG TTA ACA GGC GTC AGT GAA GAA CTG GGG GCG ACA	864
Gln Ile Ala Glu Arg Leu Thr Gly Val Ser Glu Glu Leu Gly Ala Thr	
275 280 285	
CGA GCA CAA GTT GCG CTG GCC TGG TTG TTG AGT AAA CCG GGC ATT GCC	912
Arg Ala Gln Val Ala Leu Ala Trp Leu Leu Ser Lys Pro Gly Ile Ala	
290 295 300	
GCA CCG ATT ATC GGA ACT TCG CGC GAA GAA CAG CTT GAT GAG CTA TTG	960
Ala Pro Ile Ile Gly Thr Ser Arg Glu Glu Gln Leu Asp Glu Leu Leu	
305 310 315 320	
AAC GCG GTG GAT ATC ACT TTG AAG CCG GAA CAG ATT GCC GAA CTG GAA	1008
Asn Ala Val Asp Ile Thr Leu Lys Pro Glu Gln Ile Ala Glu Leu Glu	
325 330 335	

特平 1 0 - 1 0 3 1 0 1

ACG CCG TAT AAA CCG CAT CCT GTC GTA GGA TTT AAA 1044

Thr Pro Tyr Lys Pro His Pro Val Val Gly Phe Lys

340

345

【 0 1 3 1 】

配列番号 : 10

配列の長さ : 1194

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源

生物名 : Escherichia coli

株名 : W3110

配列

ATG AAG CAA CTC ACC ATT CTG GGC TCG ACC GGC TCG ATT GGT TGC AGC 48

Met Lys Gln Leu Thr Ile Leu Gly Ser Thr Gly Ser Ile Gly Cys Ser

1

5

10

15

ACG CTG GAC GTG GTG CGC CAT AAT CCC GAA CAC TTC CGC GTA GTT GCG 96

Thr Leu Asp Val Val Arg His Asn Pro Glu His Phe Arg Val Val Ala

20

25

30

CTG GTG GCA GGC AAA AAT GTC ACT CGC ATG GTA GAA CAG TGC CTG GAA 144

Leu Val Ala Gly Lys Asn Val Thr Arg Met Val Glu Gln Cys Leu Glu

35

40

45

TTC TCT CCC CGC TAT GCC GTA ATG GAC GAT GAA GCG AGT GCG AAA CTT 192

Phe Ser Pro Arg Tyr Ala Val Met Asp Asp Glu Ala Ser Ala Lys Leu

50

55

60

CTT AAA ACG ATG CTA CAG CAA CAG GGT AGC CGC ACC GAA GTC TTA AGT 240

Leu Lys Thr Met Leu Gln Gln Gln Gly Ser Arg Thr Glu Val Leu Ser

65

70

75

80

GGG CAA CAA GCC GCT TGC GAT ATG GCA GCG CTT GAG GAT GTT GAT CAG	288
Gly Gln Gln Ala Ala Cys Asp Met Ala Ala Leu Glu Asp Val Asp Gln	
85 90 95	
GTG ATG GCA GCC ATT GTT GGC GCT GCT GGG CTG TTA CCT ACG CTT GCT	336
Val Met Ala Ala Ile Val Gly Ala Ala Gly Leu Leu Pro Thr Leu Ala	
100 105 110	
GCG ATC CGC GCG GGT AAA ACC ATT TTG CTG GCC AAT AAA GAA TCA CTG	384
Ala Ile Arg Ala Gly Lys Thr Ile Leu Leu Ala Asn Lys Glu Ser Leu	
115 120 125	
GTT ACC TGC GGA CGT CTG TTT ATG GAC GCC GTA AAG CAG AGC AAA GCG	432
Val Thr Cys Gly Arg Leu Phe Met Asp Ala Val Lys Gln Ser Lys Ala	
130 135 140	
CAA TTG TTA CCG GTC GAT AGC GAA CAT AAC GCC ATT TTT CAG AGT TTA	480
Gln Leu Leu Pro Val Asp Ser Glu His Asn Ala Ile Phe Gln Ser Leu	
145 150 155 160	
CCG CAA CCT ATC CAG CAT AAT CTG GGA TAC GCT GAC CTT GAG CAA AAT	528
Pro Gln Pro Ile Gln His Asn Leu Gly Tyr Ala Asp Leu Glu Gln Asn	
165 170 175	
GGC GTG GTG TCC ATT TTA CTT ACC GGG TCT GGT GGC CCT TTC CGT GAG	576
Gly Val Val Ser Ile Leu Leu Thr Gly Ser Gly Gly Pro Phe Arg Glu	
180 185 190	
ACG CCA TTG CGC GAT TTG GCA ACA ATG ACG CCG GAT CAA GCC TGC CGT	624
Thr Pro Leu Arg Asp Leu Ala Thr Met Thr Pro Asp Gln Ala Cys Arg	
195 200 205	
CAT CCG AAC TGG TCG ATG GGG CGT AAA ATT TCT GTC GAT TCG GCT ACC	672
His Pro Asn Trp Ser Met Gly Arg Lys Ile Ser Val Asp Ser Ala Thr	
210 215 220	
ATG ATG AAC AAA GGT CTG GAA TAC ATT GAA GCG CGT TGG CTG TTT AAC	720
Met Met Asn Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Glu Ala Arg Trp Leu Phe Asn	

特平 1 0 — 1 0 3 1 0 1

225	230	235	240	
GCC AGC GCC AGC CAG ATG GAA GTG CTG ATT CAC CCG CAG TCA GTG ATT				768
Ala Ser Ala Ser Gln Met Glu Val Leu Ile His Pro Gln Ser Val Ile				
245	250	255		
CAC TCA ATG GTG CGC TAT CAG GAC GGC AGT GTT CTG GCG CAG CTG GGG				816
His Ser Met Val Arg Tyr Gln Asp Gly Ser Val Leu Ala Gln Leu Gly				
260	265	270		
GAA CCG GAT ATG GTA CGC CAA TTG CCC ACA CCA TGG GCA TGG CCG AAT				864
Glu Pro Asp Met Val Arg Gln Leu Pro Thr Pro Trp Ala Trp Pro Asn				
275	280	285		
CGC GTG AAC TCT GGC GTG AAG CCG CTC GAT TTT TGC AAA CTA AGT GCG				912
Arg Val Asn Ser Gly Val Lys Pro Leu Asp Phe Cys Lys Leu Ser Ala				
290	295	300		
TTG ACA TTT GCC GCA CCG GAT TAT GAT CGT TAT CCA TGC CTG AAA CTG				960
Leu Thr Phe Ala Ala Pro Asp Tyr Asp Arg Tyr Pro Cys Leu Lys Leu				
305	310	315	320	
GCG ATG GAG GCG TTC GAA CAA GGC CAG GCA GCG ACG ACA GCA TTG AAT				1008
Ala Met Glu Ala Phe Glu Gln Gly Gln Ala Ala Thr Thr Ala Leu Asn				
325	330	335		
GCC GCA AAC GAA ATC ACC GTT GCT GCT TTT CTT GCG CAA CAA ATC CGC				1056
Ala Ala Asn Glu Ile Thr Val Ala Ala Phe Leu Ala Gln Gln Ile Arg				
340	345	350		
TTT ACG GAT ATC GCT GCG TTG AAT TTA TCC GTA CTG GAA AAA ATG GAT				1104
Phe Thr Asp Ile Ala Ala Leu Asn Leu Ser Val Leu Glu Lys Met Asp				
355	360	365		
ATG CGC GAA CCA CAA TGT GTG GAC GAT GTG TTA TCT GTT GAT GCG AAC				1152
Met Arg Glu Pro Gln Cys Val Asp Asp Val Leu Ser Val Asp Ala Asn				
370	375	380		
GCG CGT GAA GTC GCC AGA AAA GAG GTG ATG CGT CTC GCA AGC				1194

Ala Arg Glu Val Ala Arg Lys Glu Val Met Arg Leu Ala Ser

385

390

395

【0132】

配列番号 : 11

配列の長さ : 4390

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源

生物名 : Escherichia coli

株名 : XL1-Blue

配列

ATGGCGGCAA TGGTTCGTTG GCAAGCCTTA AGCGACTTGT ATAGGGAAAA ATACAGCAGC 60
CCACACCTGC GGCTGCATCC AGGCGCGGAA GTATACCACT AACATCGCTT TGCTGTGCAC 120
ATCACCTTAC CATTGCGCGT TATTGCTAT TTGCCCTGAG TCCGTTACCA TGACGGGGCG 180
AAAAATATTG AGAGTCAGAC ATTCATT ATG CCG AAG AAA AAT GAG GCG CCC GCC 234

Met Pro Lys Lys Asn Glu Ala Pro Ala

1

5

AGC TTT GAA AAG GCG CTG AGC GAG CTG GAA CAG ATT GTA ACC CGT CTG 282

Ser Phe Glu Lys Ala Leu Ser Glu Leu Glu Gln Ile Val Thr Arg Leu

10

15

20

25

GAA AGT GGC GAC CTG CCG CTG GAA GAG GCG CTG AAC GAG TTC GAA CGC 330

Glu Ser Gly Asp Leu Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Glu Phe Glu Arg

30

35

40

GGC GTG CAG CTG GCA CGT CAG GGG CAG GCC AAA TTA CAA CAA GCC GAA 378

Gly Val Gln Leu Ala Arg Gln Gly Gln Ala Lys Leu Gln Gln Ala Glu

45

50

55

CAG CGC GTA CAA ATT CTG CTG TCT GAC AAT GAA GAC GCC TCT CTA ACC 426

特平 1 0 — 1 0 3 1 0 1

Gln Arg Val Gln Ile Leu Leu Ser Asp Asn Glu Asp Ala Ser Leu Thr			
60	65	70	
CCT TTT ACA CCG GAC AAT GAG TA ATG GAC TTT CCG CAG CAA CTC GAA	473		
Pro Phe Thr Pro Asp Asn Glu	Met Asp Phe Pro Gln Gln Leu Glu		
	1	5	
GCC TGC GTT AAG CAG GCC AAC CAG GCG CTG AGC CGT TTT ATC GCC CCA	521		
Ala Cys Val Lys Gln Ala Asn Gln Ala Leu Ser Arg Phe Ile Ala Pro			
10	15	20	
CTG CCC TTT CAG AAC ACT CCC GTG GTC GAA ACC ATG CAG TAT GGC GCA	569		
Leu Pro Phe Gln Asn Thr Pro Val Val Glu Thr Met Gln Tyr Gly Ala			
25	30	35	40
TTA TTA GGT GGT AAG CGC CTG CGA CCT TTC CTG GTT TAT GCC ACC GGT	617		
Leu Leu Gly Gly Lys Arg Leu Arg Pro Phe Leu Val Tyr Ala Thr Gly			
	45	50	55
CAT ATG TTC GGC GTT AGC ACA AAC ACG CTG GAC GCA CCC GCT GCC GCC	665		
His Met Phe Gly Val Ser Thr Asn Thr Leu Asp Ala Pro Ala Ala Ala			
	60	65	70
GTT GAG TGT ATC CAC GCT TAC TCA TTA ATT CAT GAT GAT TTA CCG GCA	713		
Val Glu Cys Ile His Ala Tyr Ser Leu Ile His Asp Asp Leu Pro Ala			
	75	80	85
ATG GAT GAT GAC GAT CTG CGT CGC GGT TTG CCA ACC TGC CAT GTG AAG	761		
Met Asp Asp Asp Asp Leu Arg Arg Gly Leu Pro Thr Cys His Val Lys			
	90	95	100
TTT GGC GAA GCA AAC GCG ATT CTC GCT GGC GAC GCT TTA CAA ACG CTG	809		
Phe Gly Glu Ala Asn Ala Ile Leu Ala Gly Asp Ala Leu Gln Thr Leu			
105	110	115	120
GCG TTC TCG ATT TTA AGC GAT GCC GAT ATG CCG GAA GTG TCG GAC CGC	857		
Ala Phe Ser Ile Leu Ser Asp Ala Asp Met Pro Glu Val Ser Asp Arg			
	125	130	135

GAC AGA ATT TCG ATG ATT TCT GAA CTG GCG AGC GCC AGT GGT ATT GCC	905
Asp Arg Ile Ser Met Ile Ser Glu Leu Ala Ser Ala Ser Gly Ile Ala	
140 145 150	
GGA ATG TGC GGT GGT CAG GCA TTA GAT TTA GAC GCG GAA GGC AAA CAC	953
Gly Met Cys Gly Gly Gln Ala Leu Asp Leu Asp Ala Glu Gly Lys His	
155 160 165	
GTA CCT CTG GAC GCG CTT GAG CGT ATT CAT CGT CAT AAA ACC GGC GCA	1001
Val Pro Leu Asp Ala Leu Glu Arg Ile His Arg His Lys Thr Gly Ala	
170 175 180	
TTG ATT CGC GCC GCC GTT CGC CTT GGT GCA TTA AGC GCC GGA GAT AAA	1049
Leu Ile Arg Ala Ala Val Arg Leu Gly Ala Leu Ser Ala Gly Asp Lys	
185 190 195 200	
GGA CGT CGT GCT CTG CCG GTA CTC GAC AAG TAT GCA GAG AGC ATC GGC	1097
Gly Arg Arg Ala Leu Pro Val Leu Asp Lys Tyr Ala Glu Ser Ile Gly	
205 210 215	
CTT GCC TTC CAG GTT CAG GAT GAC ATC CTG GAT GTG GTG GGA GAT ACT	1145
Leu Ala Phe Gln Val Gln Asp Asp Ile Leu Asp Val Val Gly Asp Thr	
220 225 230	
GCA ACG TTG GGA AAA CGC CAG GGT GCC GAC CAG CAA CTT GGT AAA AGT	1193
Ala Thr Leu Gly Lys Arg Gln Gly Ala Asp Gln Gln Leu Gly Lys Ser	
235 240 245	
ACC TAC CCT GCA CTT CTG GGT CTT GAG CAA GCC CGG AAG AAA GCC CGG	1241
Thr Tyr Pro Ala Leu Leu Gly Leu Glu Gln Ala Arg Lys Lys Ala Arg	
250 255 260	
GAT CTG ATC GAC GAT GCC CGT CAG TCG CTG AAA CAA CTG GCT GAA CAG	1289
Asp Leu Ile Asp Asp Ala Arg Gln Ser Leu Lys Gln Leu Ala Glu Gln	
265 270 275 280	
TCA CTC GAT ACC TCG GCA CTG GAA GCG CTA GCG GAC TAC ATC ATC CAG	1337
Ser Leu Asp Thr Ser Ala Leu Glu Ala Leu Ala Asp Tyr Ile Ile Gln	

特平 10-103101

285	290	295	
CGT AAT AAA TAAACAATAA GTATTAATAG GCCCCTG ATG AGT TTT GAT ATT GCC	1391		
Met Ser Phe Asp Ile Ala			
	1	5	
AAA TAC CCG ACC CTG GCA CTG GTC GAC TCC ACC CAG GAG TTA CGA CTG	1439		
Lys Tyr Pro Thr Leu Ala Leu Val Asp Ser Thr Gln Glu Leu Arg Leu			
10	15	20	
TTG CCG AAA GAG AGT TTA CCG AAA CTC TGC GAC GAA CTG CGC CGC TAT	1487		
Leu Pro Lys Glu Ser Leu Pro Lys Leu Cys Asp Glu Leu Arg Arg Tyr			
25	30	35	
TTA CTC GAC AGC GTG AGC CGT TCC AGC GGG CAC TTC GCC TCC GGG CTG	1535		
Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Ser Ser Gly His Phe Ala Ser Gly Leu			
40	45	50	
GGC ACG GTC GAA CTG ACC GTG GCG CTG CAC TAT GTC TAC AAC ACC CCG	1583		
Gly Thr Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His Tyr Val Tyr Asn Thr Pro			
55	60	65	70
TTT GAC CAA TTG ATT TGG GAT GTG GGG CAT CAG GCT TAT CCG CAT AAA	1631		
Phe Asp Gln Leu Ile Trp Asp Val Gly His Gln Ala Tyr Pro His Lys			
75	80	85	
ATT TTG ACC GGA CGC CGC GAC AAA ATC GGC ACC ATC CGT CAG AAA GGC	1679		
Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Ile Gly Thr Ile Arg Gln Lys Gly			
90	95	100	
GGT CTG CAC CCG TTC CCG TGG CGC GGC GAA AGC GAA TAT GAC GTA TTA	1727		
Gly Leu His Pro Phe Pro Trp Arg Gly Glu Ser Glu Tyr Asp Val Leu			
105	110	115	
AGC GTC GGG CAT TCA TCA ACC TCC ATC AGT GCC GGA ATT GGT ATT GCG	1775		
Ser Val Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser Ala Gly Ile Gly Ile Ala			
120	125	130	
GTT GCT GCC GAA AAA GAA GGC AAA AAT CGC CGC ACC GTC TGT GTC ATT	1823		

Val Ala Ala Glu Lys Glu Gly Lys Asn Arg Arg Thr Val Cys Val Ile	
135 140 145 150	
GGC GAT GGC GCG ATT ACC GCA GGC ATG GCG TTT GAA GCG ATG AAT CAC	1871
Gly Asp Gly Ala Ile Thr Ala Gly Met Ala Phe Glu Ala Met Asn His	
155 160 165	
GCG GGC GAT ATC CGT CCT GAT ATG CTG GTG ATT CTC AAC GAC AAT GAA	1919
Ala Gly Asp Ile Arg Pro Asp Met Leu Val Ile Leu Asn Asp Asn Glu	
170 175 180	
ATG TCG ATT TCC GAA AAT GTC GGC GCG CTC AAC AAC CAT CTG GCA CAG	1967
Met Ser Ile Ser Glu Asn Val Gly Ala Leu Asn Asn His Leu Ala Gln	
185 190 195	
CTG CTT TCC GGT AAG CTT TAC TCT TCA CTG CGC GAA GGC GGG AAA AAA	2015
Leu Leu Ser Gly Lys Leu Tyr Ser Ser Leu Arg Glu Gly Gly Lys Lys	
200 205 210	
GTT TTC TCT GGC GTG CCG CCA ATT AAA GAG CTG CTC AAA CGC ACC GAA	2063
Val Phe Ser Gly Val Pro Pro Ile Lys Glu Leu Leu Lys Arg Thr Glu	
215 220 225 230	
GAA CAT ATT AAA GGC ATG GTA GTG CCT GGC ACG TTG TTT GAA GAG CTG	2111
Glu His Ile Lys Gly Met Val Val Pro Gly Thr Leu Phe Glu Glu Leu	
235 240 245	
GGC TTT AAC TAC ATC GGC CCG GTG GAC GGT CAC GAT GTG CTG GGG CTT	2159
Gly Phe Asn Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly His Asp Val Leu Gly Leu	
250 255 260	
ATC ACC ACG CTA AAG AAC ATG CGC GAC CTG AAA GGC CCG CAG TTC CTG	2207
Ile Thr Thr Leu Lys Asn Met Arg Asp Leu Lys Gly Pro Gln Phe Leu	
265 270 275	
CAT ATC ATG ACC AAA AAA GGT CGT GGT TAT GAA CCG GCA GAA AAA GAC	2255
His Ile Met Thr Lys Lys Gly Arg Gly Tyr Glu Pro Ala Glu Lys Asp	
280 285 290	

67

440	445	450	
AAC GAA TGT CGC CAG ATG CTC TAT ACC GGC TAT CAC TAT AAC GAT GGC			2783
Asn Glu Cys Arg Gln Met Leu Tyr Thr Gly Tyr His Tyr Asn Asp Gly			
455	460	465	470
CCG TCA GCG GTG CGC TAC CCG CGT GGC AAC GCG GTC GGC GTG GAA CTG			2831
Pro Ser Ala Val Arg Tyr Pro Arg Gly Asn Ala Val Gly Val Glu Leu			
475	480	485	
ACG CCG CTG GAA AAA CTA CCA ATT GGC AAA GGC ATT GTG AAG CGT CGT			2879
Thr Pro Leu Glu Lys Leu Pro Ile Gly Lys Gly Ile Val Lys Arg Arg			
490	495	500	
GGC GAG AAA CTG GCG ATC CTT AAC TTT GGT ACG CTG ATG CCA GAA GCG			2927
Gly Glu Lys Leu Ala Ile Leu Asn Phe Gly Thr Leu Met Pro Glu Ala			
505	510	515	
GCG AAA GTC GCC GAA TCG CTG AAC GCC ACG CTG GTC GAT ATG CGT TTT			2975
Ala Lys Val Ala Glu Ser Leu Asn Ala Thr Leu Val Asp Met Arg Phe			
520	525	530	
GTG AAA CCG CTT GAT GAA GCG TTA ATT CTG GAA ATG GCC GCC AGC CAT			3023
Val Lys Pro Leu Asp Glu Ala Leu Ile Leu Glu Met Ala Ala Ser His			
535	540	545	550
GAA GCG CTG GTC ACC GTA GAA GAA AAC GCC ATT ATG GGC GGC GCA GGC			3071
Glu Ala Leu Val Thr Val Glu Glu Asn Ala Ile Met Gly Gly Ala Gly			
555	560	565	
AGC GGC GTG AAC GAA GTG CTG ATG GCC CAT CGT AAA CCA GTA CCC GTG			3119
Ser Gly Val Asn Glu Val Leu Met Ala His Arg Lys Pro Val Pro Val			
570	575	580	
CTG AAC ATT GGC CTG CCG GAC TTC TTT ATT CCG CAA GGA ACT CAG GAA			3167
Leu Asn Ile Gly Leu Pro Asp Phe Phe Ile Pro Gln Gly Thr Gln Glu			
585	590	595	
GAA ATG CGC GCC GAA CTC GGC CTC GAT GCC GCT GGT ATG GAA GCC AAA			3215

特平 1 0 — 1 0 3 1 0 1

Glu Met Arg Ala Glu Leu Gly Leu Asp Ala Ala Gly Met Glu Ala Lys
600 605 610
ATC AAG GCC TGG CTG GCA TAATCCCTAC TCCACTCCTG CTATGCTTAA 3263
Ile Lys Ala Trp Leu Ala
615 620
GAAATTATTC ATAGACTCTA AATAATTCGA GTTGCAGGAA GGCGGCAAAC GAGTGAAGCC 3323
CCAGGAGCTT ACATAAGTAA GTG ACT GGG GTG AAC GAA TGC AGC CGC AGC 3373
Val Thr Gly Val Asn Glu Cys Ser Arg Ser
1 5 10
ACA TGC AAC TTG AAG TAT GAC GAG TAT AGC AGG AGT GGC AGC ATG CAA 3421
Thr Cys Asn Leu Lys Tyr Asp Glu Tyr Ser Arg Ser Gly Ser Met Gln
15 20 25
TAC AAC CCC TTA GGA AAA ACC GAC CTT CGC GTT TCC CGA CTT TGC CTC 3469
Tyr Asn Pro Leu Gly Lys Thr Asp Leu Arg Val Ser Arg Leu Cys Leu
30 35 40
GGC TGT ATG ACC TTT GGC GAG CCA GAT CGC GGT AAT CAC GCA TGG ACA 3517
Gly Cys Met Thr Phe Gly Glu Pro Asp Arg Gly Asn His Ala Trp Thr
45 50 55
CTG CCG GAA GAA AGC AGC CGT CCC ATA ATT AAA CGT GCA CTG GAA GGC 3565
Leu Pro Glu Glu Ser Ser Arg Pro Ile Ile Lys Arg Ala Leu Glu Gly
60 65 70
GGC ATA AAT TTC TTT GAT ACC GCC AAC AGT TAT TCT GAC GGC AGC AGC 3613
Gly Ile Asn Phe Phe Asp Thr Ala Asn Ser Tyr Ser Asp Gly Ser Ser
75 80 85 90
GAA GAG ATC GTC GGT CGC GCA CTG CGG GAT TTC GCC CGT CGT GAA GAC 3661
Glu Glu Ile Val Gly Arg Ala Leu Arg Asp Phe Ala Arg Arg Glu Asp
95 100 105
GTG GTC GTT GCG ACC AAA GTG TTC CAT CGC GTT GGT GAT TTA CCG GAA 3709
Val Val Val Ala Thr Lys Val Phe His Arg Val Gly Asp Leu Pro Glu

110	115	120	
GGA TTA TCC CGT GCG CAA ATT TTG CGC TCT ATC GAC GAC AGC CTG CGA			3757
Gly Leu Ser Arg Ala Gln Ile Leu Arg Ser Ile Asp Asp Ser Leu Arg			
125	130	135	
CGT CTC GGC ATG GAT TAT GTC GAT ATC CTG CAA ATT CAT CGC TGG GAT			3805
Arg Leu Gly Met Asp Tyr Val Asp Ile Leu Gln Ile His Arg Trp Asp			
140	145	150	
TAC AAC ACG CCG ATC GAA GAG ACG CTG GAA GCC CTC AAC GAC GTG GTA			3853
Tyr Asn Thr Pro Ile Glu Glu Thr Leu Glu Ala Leu Asn Asp Val Val			
155	160	165	170
AAA GCC GGG AAA GCG CGT TAT ATC GGC GCG TCA TCA ATG CAC GCT TCG			3901
Lys Ala Gly Lys Ala Arg Tyr Ile Gly Ala Ser Ser Met His Ala Ser			
175	180	185	
CAG TTT GCT CAG GCA CTG GAA CTC CAA AAA CAG CAC GGC TGG GCG CAG			3949
Gln Phe Ala Gln Ala Leu Glu Leu Gln Lys Gln His Gly Trp Ala Gln			
190	195	200	
TTT GTC AGT ATG CAG GAT CAC TAC AAT CTG ATT TAT CGT GAA GAA GAG			3997
Phe Val Ser Met Gln Asp His Tyr Asn Leu Ile Tyr Arg Glu Glu Glu			
205	210	215	
CGC GAG ATG CTA CCA CTG TGT TAT CAG GAG GGC GTG GCG GTA ATT CCA			4045
Arg Glu Met Leu Pro Leu Cys Tyr Gln Glu Gly Val Ala Val Ile Pro			
220	225	230	
TGG AGC CCG CTG GCA AGG GGC CGT CTG ACG CGT CCG TGG GGA GAA ACT			4093
Trp Ser Pro Leu Ala Arg Gly Arg Leu Thr Arg Pro Trp Gly Glu Thr			
235	240	245	250
ACC GCA CGA CTG GTG TCT GAT GAG GTG GGG AAA AAT CTC TAT AAA GAA			4141
Thr Ala Arg Leu Val Ser Asp Glu Val Gly Lys Asn Leu Tyr Lys Glu			
255	260	265	
AGC GAT GAA AAT GAC GCG CAG ATC GCA GAG CGG TTA ACA GGC GTC AGT			4189

特平 10-103101

Ser Asp Glu Asn Asp Ala Gln Ile Ala Glu Arg Leu Thr Gly Val Ser
270 275 280
GAA GAA CTG GGG GCG ACA CGA GCA CAA GTT GCG CTG GCC TGG TTG TTG 4237
Glu Glu Leu Gly Ala Thr Arg Ala Gln Val Ala Leu Ala Trp Leu Leu
285 290 295
AGT AAA CCG GGC ATT GCC GCA CCG ATT ATC GGA ACT TCG CGC GAA GAA 4285
Ser Lys Pro Gly Ile Ala Ala Pro Ile Ile Gly Thr Ser Arg Glu Glu
300 305 310
CAG CTT GAT GAG CTA TTG AAC GCG GTG GAT ATC ACT TTG AAG CCG GAA 4333
Gln Leu Asp Glu Leu Leu Asn Ala Val Asp Ile Thr Leu Lys Pro Glu
315 320 325 330
CAG ATT GCC GAA CTG GAA ACG CCG TAT AAA CCG CAT CCT GTC GTA GGA 4381
Gln Ile Ala Glu Leu Glu Thr Pro Tyr Lys Pro His Pro Val Val Gly
335 340 345
TTT AAA TAA 4390
Phe Lys

【0133】

配列番号：12

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

CCGGATCCAT GGCGGCAATG GTTCGTTGGC AAG

33

【0134】

配列番号：13

配列の長さ：34

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

CCGAATTCTT ATTTAAATCC TACGACAGGA TGCG

34

【0135】

配列番号：14

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

CCGGATCCAT GAGTTTGTAT ATTGCCAAAT ACC

33

【0136】

配列番号：15

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

CCGAATTCTT ATGCCAGCCA GGCCTTGATT TTG

33

【0137】

配列番号：16

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

CCGAATTCTT ACTCATTGTC CGGTGTAAAA GGG

33

【0138】

配列番号：17

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

CCGGATCCAT GGACTTTCCG CAGCAACTCG AAG

33

【0139】

配列番号：18

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

CCGAATTCTT ATTTATTACG CTGGATGATG TAG

33

【0140】

配列番号：19

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

CCGGATCCTA ATCCCTACTC CACTCCTGCT ATG

33

【0141】

配列番号：20

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

GGGGGATCCA AGCAACTCAC CATTCTGGGC

30

【0142】

配列番号：21

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

GGGGGATCCG CTTGCGAGAC GCATCACCTC

30

【0143】

配列番号：22

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸、合成DNA

配列

GGGGGATCCA GTTTTGATAT TGCCAAATAC CC

32

【0144】

特平 10-103101

配列番号 : 23

配列の長さ : 32

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸、合成DNA

配列

GGGGGATCCT GCCAGCCAGG CCTTGATTTT GG

32

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 心疾患、骨粗鬆症、止血、がん予防、免疫賦活等を目的とした医薬品、健康食品および貝類付着防止塗料等に有用なイソプレノイド化合物の製造法を提供する。

【解決手段】 本発明によれば、イソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質をコードするDNAを1つ以上含むDNAをベクターに組み込み、得られた組換え体DNAを宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培地に培養し、培養物中に該蛋白質あるいはイソプレノイド化合物を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質あるいはイソプレノイド化合物を採取することを特徴とする、該蛋白質あるいはイソプレノイド化合物の製造法、および該蛋白質を提供することができる。

【選択図】 なし

特平 10-103101

【書類名】
【訂正書類】

職権訂正データ
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

申請人

【識別番号】

000001029

【住所又は居所】

東京都千代田区大手町1丁目6番1号

【氏名又は名称】

協和醗酵工業株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001029]

1. 変更年月日	1990年 8月 6日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区大手町1丁目6番1号
氏 名	協和醗酵工業株式会社

